

ANNALES DE L'INSTITUT PASTEUR

FONDÉES SOUS LE PATRONAGE DE **L. PASTEUR**

PAR

E. DUCLAUX

ET CONTINUÉES PAR

E. ROUX (1904)

A. CALMETTE (1922)

COMITÉ DE DIRECTION

**Gab. BERTRAND, E. LEGLAINCHE, L. MARTIN,
G. RAMON, J. TRÉFOUËL,**

assistés des Professeurs et Chefs de service de l'Institut Pasteur,

Secrétaire général : A. BOQUET.

QR

1

A775

TOME SOIXANTE-SEPTIÈME

V.67

Juillet-Décembre 1941

July-Dec.

1941

PER

PARIS

MASSON ET C^{ie}, ÉDITEURS
LIBRAIRES DE L'ACADEMIE DE MÉDECINE
120, Boulevard Saint-Germain (6^e).

PARIS. — ANC^{NE} IMP. DE LA COUR D'APPEL, 4, RUE CASSETTE. — 1941.

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

GIOVANNI MALFITANO

(1872-1941)

L'Institut Pasteur vient de perdre un de ses plus anciens, de ses plus distingués, de ses plus modestes collaborateurs, Giovanni Malfitano.

On ne peut retracer l'œuvre scientifique de ce savant sans l'associer, continuellement, à sa personnalité si pleine des plus grandes vertus humaines.

La vie de G. Malfitano fut un rêve continual ; un rêve scientifique, philosophique, sociologique, humanitaire. G. Malfitano regardait toujours à l'infini, désirant découvrir partout la vérité, l'harmonie, la justice, le bonheur de tous. Dans la recherche de cet idéal, il fit abstraction de sa propre personne. Il resta presque en marge de cette Société qu'il voulait infiniment bonne.

En 1914, il s'engagea dans la Légion Garibaldienne ; il combattit pour la France.

Dix ans avant de mourir, il devint aveugle. Il vécut alors

dans son laboratoire, avec ses pensées et le souvenir de ses expériences, tout en dictant à ses collaborateurs ses si subtiles considérations théoriques et philosophiques. Tous ceux qui l'approchèrent, dans son isolement, l'aimèrent et l'admirèrent profondément.

G. Malfitano est né le 28 septembre 1872 à Syracuse. Il étudia la chimie à l'Université de Syracuse, puis à Palerme. Il débuta dans l'industrie chimique du caoutchouc dans les Etablissements Pirelli à Milan. Il ne devait rester que peu de temps en Italie, où il publia, à Pavie, en 1897, un travail sur le *Comportement des microorganismes sous l'effet des compressions gazeuses*.

En 1899, G. Malfitano vint à Paris. Emile Duclaux l'encouragea à venir travailler à l'Institut Pasteur. Il y resta jusqu'à sa mort. L'Institut Pasteur a toujours été son unique famille. Il s'est éteint le 6 avril, à l'hôpital Pasteur.

Emile Duclaux mit G. Malfitano en rapport avec Jean Perrin et toute la pléiade des jeunes physiciens qui gravitaient autour de lui.

A côté de ces savants, G. Malfitano acquit sa foi d'atomiste, tout en terminant, de 1900 à 1903, les travaux qu'il avait entrepris sur *Les Protéases de l'Aspergillus niger et de la Bactéridie charbonneuse*.

Dès 1906, G. Malfitano trouva sa voie : celle de l'*Etude des Colloïdes et de leur constitution* qui le conduisit à l'étude des *Ultrafiltrations* et à celle de la *Constitution de la micelle de l'amidon*.

Les travaux de G. Malfitano l'ont amené à énoncer une *Conception générale de la constitution des colloïdes*, dérivant de la théorie des complexes werneriens. Ils l'ont conduit à se représenter la micelle comme un complexe construit par groupement de molécules, de complexes, de polymères ou de micelles d'ordre inférieur autour d'un ion central.

Le point de départ de ces considérations, Malfitano le trouva dans les travaux qu'il publia de 1904 à 1910 sur les *Colloïdes chloro-ferriques*. Il étudia la synthèse d'un composé micellaire inorganique, l'oxyde ferrique chloruré, en partant d'un composé moléculaire FeCl_3 . Il vit les micelles hydro-chloro-ferriques se former durant l'hydrolyse de FeCl_3 , tout comme

si des molécules d'hydroxyde, en nombre petit et constant, s'associaient avec un ion ferrique pour constituer des ions complexes compensés par Cl. Ces unités ne s'accroissent pas, individuellement, par addition de nouvelles molécules. Mais, lorsque leur nombre augmente, et lorsque l'hydrolyse les rend non ionisables et insolubles, ces complexes en entier s'associent en nombre petit et constant avec les cations de complexes semblables, pour constituer des complexes d'ordre supérieur qui sont les *Micelles*. Celles-ci, à leur tour et suivant les mêmes règles, constituent des micelles de deuxième et troisième degré qui atteignent des dimensions perceptibles à l'ultra-microscope.

L'*Ultrafiltration* dont G. Malfitano est le promoteur lui permit de séparer, à travers la paroi de sacs de collodium, les micelles du liquide intermicellaire et de faire, sur les fractions obtenues, des mesures de conductibilité électrique d'où il tira, dans le cas des colloïdes chloro-ferriques, une confirmation de l'agrégation par paliers des éléments constitutifs des micelles.

Dès 1910, G. Malfitano appliqua, à l'étude de la *Constitution de la micelle de l'amidon*, les données qu'il avait acquises au cours de ses études sur la micelle chloro-ferrique. Avec M. Catoire, il démontra que l'amidon naturel est constitué par des micelles biologiques qui sont constituées de micelles chimiques, et que celles-ci sont des complexes de complexes organo-minéraux. Le complexe qui est le constituant de base de l'amidon est un composé d'amyolose avec des silicates et des phosphates alcalino-terreux. L'amyolose est un polymère de polymères de molécules $C_6H^{10}O_5 \cdot H_2O$. Elle n'existe, séparée de la part minérale, qu'après dislocation des micelles de l'amidon naturel. Les complexes amylo-siliciques constituent l'amylocellulose ; les complexes amylo-phosphoriques constituent l'amylopectine.

G. Malfitano montra qu'il existe, dans les composés minéraux et minéralogiques, des corps présentant la structure de complexe de complexes et qui n'avaient jamais été rattachés aux colloïdes. Ses élèves publieront, plus tard, la généralisation de ces vues dans le domaine de la chimie organique et biologique.

Ayant assisté aux premières découvertes de l'Atomistique, G. Malfitano suivait passionnément ses progrès. Il reconnut les similitudes structurales entre la représentation électronique de l'atome et celle qu'il attribuait à ses unités micellaires. Les périodicités de la classification de Mendeleieff lui apparurent comme un indice certain de l'enchaînement des structures atomiques selon un ordre de complexité croissante. Il jeta, ainsi, les bases d'une *Théorie unitaire de la constitution des unités matérielles* (depuis l'atome jusqu'aux micelles biologiques les plus complexes), fondée sur trois types structuraux fondamentaux : ionique, polaire, iono-polaire, et sur le mode d'agrégation de ces unités par degrés croissants de complexité.

En profond philosophe, G. Malfitano étendit aux connaissances humaines, en général, la conception de cette constitution. Tantôt sous son nom, tantôt avec son élève A. Honnolaitre, tantôt sous le pseudonyme de G. Aporema, G. Malfitano publia des travaux dans lesquels il ramène l'ensemble des connaissances humaines à des complexes : 1^o *complexes matériels* constitués par la juxtaposition d'atomes, de molécules, de plurimolécules, de micelles, c'est-à-dire par *combinaison* ; 2^o *complexes biologiques* constitués par assimilation de complexes matériels et par développement de cellules, de tissus, d'organes, c'est-à-dire par *organisation* ; 3^o *complexes sociaux* constitués par association plus ou moins volontaire des complexes biologiques que sont les hommes, c'est-à-dire par *délégation* ; 4^o *complexes idéologiques* qui aboutissent aux connaissances scientifiques par *idéation*.

G. Malfitano préparait, depuis de longues années, la publication d'une théorie unitaire de la *Connaissance humaine* comprenant, entre autres, une Logique, une Epistémologie et une Sémantique, s'intégrant dans une théorie générale du « Parler sensé » ou *Orthologie*.

Deux jours avant sa mort, sur son lit d'hôpital, dans les ténèbres de sa cécité, G. Malfitano dictait encore à M. Catoire un chapitre de son dernier volume de *Chimie micellaire*.

Ses disciples continueront, avec piété, son œuvre de savant et de philosophe.

E. POZERSKI.

RECHERCHES SUR LE SULFAMIDE ET LES ANTISULFAMIDES

- I. — ACTION DU SULFAMIDE SUR LE FLAGELLÉ *POLYTOMELLA CAECA*
- II. — ACTION ANTISULFAMIDE DE L'ACIDE *p*-AMINOBENZOÏQUE
EN FONCTION DU pH

par A. LWOFF, F. NITTI, M^{me} J. TRÉFOUËL et M^{me} V. HAMON.

(*Institut Pasteur.*)

Peu après l'introduction par J. et M^{me} J. Tréfouël, F. Nitti et D. Bovet du sulfamide (1162 F) en thérapeutique, E. Fourneau, J. et M^{me} J. Tréfouël, F. Nitti et D. Bovet constataient que ce corps « n'exerce pas une action antiseptique à proprement parler, mais une action empêchante ». Ces auteurs mettaient d'autre part en opposition la toxicité très particulière du sulfamide sur la cellule végétale et son innocuité pour la cellule animale. La question du mode d'action du sulfamide est restée obscure jusqu'à la découverte par Stamp et Green des antisulfamides et à l'identification des antisulfamides (Woods et Fildes, Woods). Les travaux des auteurs anglais ont conduit à la conclusion que le sulfamide inhibe une réaction enzymatique dont le substrat normal est l'acide *p*-aminobenzoïque. On ignore cependant encore ce que représente cette réaction dans le métabolisme des micro-organismes. C'est ce problème que nous avons essayé d'aborder en prenant comme matériel le flagellé *Polytomella caeca*. L'étude des flagellés semblait aussi devoir présenter un intérêt propre. Il existe en effet parmi eux des organismes nettement animaux, dépourvus de plastes et de chlorophylle : Protozoaires au sens strict ; des organismes nettement végétaux, pourvus de plastes et de chlorophylle : les Chlorophytes, et enfin des organismes intermédiaires, dépourvus de pigment assimilateur, mais possédant un plaste et réalisant la synthèse de réserves glucidiques figurées : les Leucophytes. C'est précisément

ment à ceux-ci qu'appartient *Polytomella caeca*. Le sulfamide agit, nous l'avons noté, en empêchant le développement des végétaux : plantes supérieures, moisissures, bactéries, et non celui des animaux (Fourneau, M. et M^{me} Tréfouël, Nitti et Bovet, 1936). On pouvait donc essayer d'appliquer le critère sulfamide pour situer certains organismes oscillant à la limite des deux règnes. Disons tout de suite que le flagellé *Polytomella caeca* s'est révélé sensible au sulfamide, c'est-à-dire s'est comporté comme un végétal.

I. — Action du sulfamide sur le flagellé *Polytomella caeca*.

SOUCHE, MILIEUX. — Nous avons utilisé la souche isolée par A. Lwoff (1935) à partir d'un seul flagellé. Les milieux suivants ont servi pour les expériences :

1 ^o Asparagine purifiée, en grammes.	2
Acétate de Na, en grammes.	2
Chlorure de Na, en gramme	0,1
Sulfate de Mg, en gramme	0,1
Phosphate monopotassique, en gramme	0,5
Aneurine, en milligramme	0,3
Eau bidistillée, en grammes	4.000

Après stérilisation, on ajoute pour 5 cent. cubes de milieu I goutte de la solution suivante stérilisée à part :

	GRAMMES
Citrate ferrique.	1
Chlorure de Ca	1
Eau bidistillée	4.000

Le pH des milieux, mesuré au potentiomètre de Coleman à électrode de verre, est ajusté, suivant le cas, avec de la soude, de l'acide sulfurique, chlorhydrique ou acétique.

2^o Même milieu que 1^o, où l'asparagine et l'acétate de sodium sont remplacés par l'acétate d'ammonium.

3^o Même milieu que 1^o, où l'acétate de sodium est remplacé par l'éthanol.

Pour les expériences en milieu neutre à pH constant, nous

avons utilisé un mélange de 100 parties du milieu 2° et 30 parties du milieu 3°. Pour la plupart des autres expériences, nous avons employé le milieu n° 1, ajusté soit par la soude ou le carbonate de sodium, soit par l'acide sulfurique. Pour des pH compris entre 4,2 et 2,2, il n'y a pas de variations importantes de la concentration en ions H pendant les quarante-cinq premières heures du développement de la culture. Pour les pH compris entre 4,5 et 6, on peut tamponner le milieu avec de l'acide citrique. D'une façon générale, les conditions dans lesquelles nous avons opéré étaient telles qu'il n'y avait pas de variation sensible du pH pendant les deux premiers jours.

INFLUENCE DE L'ENSEMENCEMENT ET DU pH DU MILIEU. — Si l'on ensemence des tubes de 17 millimètres de diamètre renfermant 5 cent. cubes de milieu de culture, la vitesse de développement varie, bien entendu, avec de nombreux facteurs.

1° La température. — Toutes nos expériences ont été effectuées à 22°.

2° L'âge de la souche. — Pour *Polytomella caeca*, comme pour tous les micro-organismes, le départ de la culture est plus rapide si l'on ensemence les flagellés prélevés pendant la phase logarithmique de croissance que si l'on ensemence les flagellés prélevés pendant la phase de décroissance.

3° L'importance de l'ensemencement.

Ce sont là des données classiques, mais au cours de l'étude de l'influence quantitative du sulfamide, les conditions de l'expérimentation doivent être rigoureusement constantes si l'on veut obtenir des résultats comparables.

Si l'on ensemence des tubes de 5 cent. cubes de milieu avec une souche prélevée à la phase logarithmique de croissance ou à son voisinage immédiat, souche contenant de 250 à 450 flagellés par millimètre cube, de façon telle que la concentration initiale soit de 3 à 5 flagellés par millimètre cube, on obtient en trente-huit à quarante-huit heures, à 22°, une culture renfermant environ 1.000 à 1.500 flagellés par millimètre cube. A ce moment, le stade logarithmique est dépassé et la culture continue à se développer plus lentement jusqu'à

atteindre des concentrations supérieures à 3.000 flagellés par millimètre cube.

En présence de sulfamide les résultats sont différents suivant que l'on pratique un ensemencement faible ou abondant. C'est ainsi qu'à pH 4,1 avec ensemencement à raison de 4 flagellés par millimètre cube, on n'observe de culture abon-

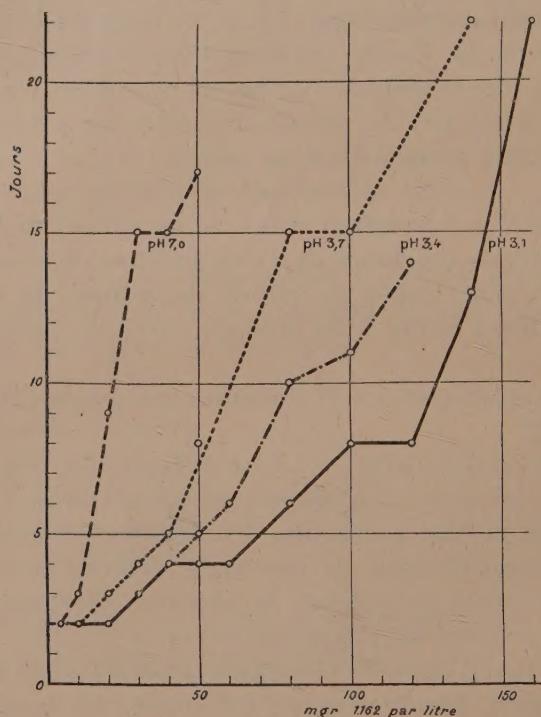


FIG. 1. — Influence du pH sur l'action du sulfamide sur *Polytomella coeca*.
En abscisses : concentration du sulfamide dans le milieu en milligrammes par litre. En ordonnées : nombre de jours nécessaires pour que la culture atteigne une densité de 1.500 flagellés par millimètre cube.

dante après quarante-huit heures que pour des concentrations en sulfamide égales ou inférieures à 20 milligrammes par litre. Au contraire, après un large ensemencement — 68 flagellés par millimètre cube, par exemple — la culture est abondante après quarante-huit heures en présence de sulfamide à une concentration de 120 milligrammes par litre.

4° *Le pH du milieu.* — En milieu neutre les flagellés sont beaucoup plus sensibles au sulfamide qu'en milieu acide.

Pour donner une mesure de l'action du sulfamide, nous avons noté le moment où la culture témoin atteint la concentration de 1.500 flagellés environ par millimètre cube et le moment où cette même concentration était atteinte en présence de sulfamide. Sur la figure 1 ci-contre, on a porté en abscisses la concentration de sulfamide en milligrammes par litre et en ordonnées le jour auquel la culture atteint la concentration de 1.500 flagellés par millimètre cube. On voit qu'à pH 7 on note déjà un retard de vingt-quatre heures pour une concentration de 10 milligrammes par litre. Il y a un retard de treize jours pour une concentration de 30 milligrammes par litre. A pH 3,4 le retard est de treize jours pour une concentration de 145 milligrammes par litre.

La comparaison des courbes montre qu'à pH 4 il faut environ cinq fois plus de sulfamide qu'à pH 7 pour produire le même effet sur les flagellés. L'examen des courbes montre également que les flagellés ne sont pas tués par le sulfamide, mais que leur reproduction est simplement différée puisqu'ils arrivent à se multiplier en présence de quantités notables de cette substance après un délai plus ou moins long. Le comportement des flagellés entre l'ensemencement et le départ de la culture sera examiné dans un paragraphe ultérieur.

ESSAI D'ADAPTATION AU SULFAMIDE. — Premier passage : à partir d'une souche contenant 3.700 flagellés par millimètre cube, on ensemence une série de tubes contenant de 50 à 110 milligrammes de sulfamide par litre : concentration initiale en flagellés, 30 par millimètre cube. Pour la concentration de 110 milligrammes par litre, la multiplication n'est active que vers le quatorzième jour ; il y a, à ce moment 500 flagellés par millimètre cube.

Deuxième passage : un deuxième passage est alors effectué ; concentration initiale en flagellés, 5 par millimètre cube. La culture dans les tubes témoins est abondante le troisième jour. En présence de sulfamide à raison de 120 milligrammes par litre, le développement ne commence que le cinquième jour. A ce moment, on effectue un troisième passage.

Troisième passage : la concentration initiale est de 4 flagellés par millimètre cube. Dans ces conditions, une culture normale non adaptée se développerait vers le quinzième jour pour une concentration en sulfamide de 70 à 80 milligrammes par litre. Or la souche adaptée se développe le quinzième jour pour une concentration de 300 milligrammes de sulfamide par litre (v. fig. 2).

Il y a donc eu augmentation de la tolérance au sulfamide ;

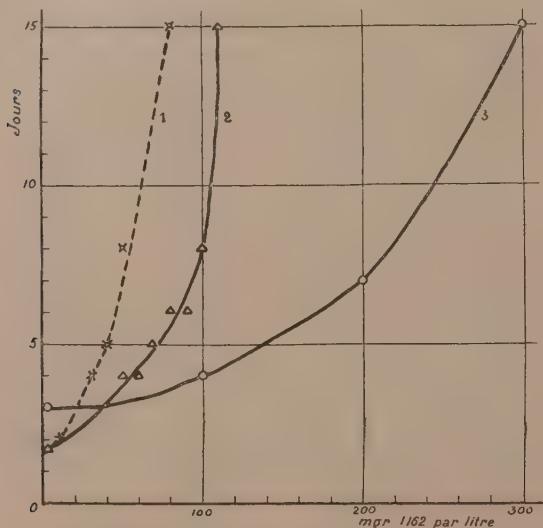


Fig. 2. — Adaptation de *Polytomella cæca* au sulfamide.

En abscisses : concentration du sulfamide en milligrammes par litre. En ordonnées : nombre de jours nécessaire pour que la culture atteigne une densité de 1.500 flagellés par millimètre cube; 1, culture témoin à pH 3,7 (ensemencement 4 flagellés par millimètre cube); 2, premier passage en milieu de pH 4,1 (ensemencement 30 flagellés par millimètre cube); 3, troisième passage en milieu de pH 4,0 (ensemencement 4 flagellés par millimètre cube). Comparer avec la courbe 1.

nous n'avons pas poursuivi ces essais, mais il nous paraît très improbable que le maximum de l'accoutumance ait été atteint. La question de savoir s'il s'agit d'une sélection d'organismes résistants ou d'une augmentation de la résistance n'a pas été abordée. De l'ensemble des expériences sur le comportement des cultures, il semble bien qu'il s'agisse d'une adaptation qui pourrait être due à une augmentation de la

production d'antisulfamide. Pour ce qui concerne les bactéries, un phénomène typique d'augmentation de la résistance au sulfamide a été décrit par Nitti, Philippe et Bovet (1939) dans le cas du bacille diphtérique.

L'ACTION « BACTÉRIOSTATIQUE » DU SULFAMIDE. Il est actuellement démontré que le sulfamide n'exerce pas une action bactéricide *in vitro*, mais une action « bactériostatique » (Colebrook, Buttle et O'Meana, 1936 ; Nitti et Bovet, 1936, etc.). D'autre part, les travaux de Wolf et Julius (1939) et de Lockwood (1938) ont montré que les bactéries ensemencées dans un milieu renfermant du sulfamide, se comportaient pendant quelques heures comme les bactéries témoins, c'est-à-dire qu'elles se divisaient de trois à cinq fois. La plupart des expériences, sinon toutes, ayant abouti à cette conclusion, ont été effectuées dans des milieux complexes organiques : eau peptonée, bouillon, sang, c'est-à-dire dans des milieux renfermant des antisulfamides. Les conclusions restent cependant valables dans leur ensemble, parce que les auteurs ont opéré en présence d'un excès de sulfamide. *Polytomella caeca* se comporte comme les bactéries. Les flagellés prélevés dans un milieu neuf à la phase logarithmique de croissance et ensemencés dans un milieu renfermant du sulfamide subissent 2 à 3 divisions ; puis la multiplication s'arrête. Les flagellés restent mobiles et parfaitement aptes à se reproduire. En effet :

1° La multiplication reprend avec un retard qui varie de un à vingt jours, suivant le pH du milieu et la concentration en sulfamide.

2° On peut à un moment quelconque provoquer le développement d'une culture bloquée en ajoutant de l'acide *p*-aminobenzoïque en proportion convenable. Nous reviendrons ultérieurement sur l'action de cette substance. Rappelons pour le moment que son action antisulfamide a été découverte par Woods et Fildes, travaillant sur le streptocoque et sur *E. coli*. Les expériences montrent : a) que l'action antagoniste de l'acide *p*-aminobenzoïque vis-à-vis du sulfamide s'exerce également sur *Polytomella caeca* ; b) que non seulement cette substance empêche l'action inhibitrice de se

manifester, mais aussi qu'elle permet le départ de la multiplication de cultures bloquées depuis plusieurs semaines. Les flagellés qui subissent l'action du sulfamide ne se reproduisent donc pas, mais ils restent vivants et aptes à se reproduire soit lorsqu'ils sont « adaptés », soit lorsque l'action du sulfamide est contre-balancée par celle de l'acide *p*-aminobenzoïque.

Dans les conditions de culture habituelles, il s'écoule environ trois heures et demie à quatre heures entre deux divisions. Les cultures peuvent rester bloquées pendant trois semaines au moins, c'est-à-dire pendant une durée qui représente cent vingt fois, au moins, le temps séparant deux divisions.

Nous allons essayer d'analyser cet arrêt de la reproduction.

MODIFICATIONS MORPHOLOGIQUES DES ORGANISMES INHIBÉS.

J. S. Lockwood (1938) a étudié les variations morphologiques des streptocoques sous l'influence du sulfamide. Voici ce que dit Lockwood : « Durant les cinq premières heures, il n'y a pas de changement morphologique. Aux environs de la huitième heure, au moment du ralentissement de la croissance qui était jusque-là à peu près normale, logarithmique, un changement notable apparaît. Il y a, tout d'abord, persistance, de la huitième à la douzième heure, de la capsule qui dans les tubes témoins n'existe que dans les quatre premières heures et disparaît dès que la croissance rapide commence. De pair avec la persistance de cette capsule, il y a une augmentation marquée de la taille des éléments et une tendance à la formation de chaînes beaucoup plus longues que dans les témoins. Il semble que les organismes soient enchaînés dans une enveloppe cylindrique non colorable qui s'oppose aux influences mécaniques tendant, dans les conditions normales, à la séparation des cocci après division. » Et Lockwood ajoute : « Ce changement morphologique est un précurseur nécessaire de la diminution de la vitesse de croissance, quoique les deux phénomènes puissent être mis en évidence presque simultanément. » Et plus loin Lockwood parle de formes de dégénérescence hypertrophiées (« swollen degeneration forms »).

S. Luria (1939) étudiant l'action du sulfamide sur *E. coli*,

constate qu'après les premières divisions, les bactéries « deviennent plus grosses et plus réfringentes que les bactéries normales... Une petite partie des germes ensemencés, au lieu de se diviser, s'allongent jusqu'à quatre, cinq et dix fois la longueur normale. Cette modification n'a rien de spécifique et nous l'avons retrouvée dans toutes les conditions anormales de culture, bactéries vieilles, cultures à 18°, etc... ».

Il est possible que ces bactéries hypertrophiées sous l'influence du sulfamide aient été vues par de nombreux auteurs. Nous n'avons pas trouvé d'autre mention de ces observations dans les mémoires originaux ni dans les mises au point générales que nous avons consultés. Il est possible, étant donné le très grand nombre de travaux parus sur la question, que certaines observations aient pu nous échapper.

Dès nos premiers essais sur *Polytomella*, nous avions été frappés, au simple examen des tubes de culture au faible grossissement, par la différence de taille considérable entre les flagellés témoins et les flagellés traités par le sulfamide ; ceux-ci étaient beaucoup plus volumineux que ceux-là. Nous avons alors mesuré les flagellés dans différentes conditions et calculé leur volume d'après des modèles en cire isomorphes. Dans une culture à pH 3,9, âgée de vingt heures, normale, dont la densité est de 196 flagellés par millimètre cube, la dimension moyenne des flagellés est de 12,5/8,5 μ , ce qui correspond à un volume de 580 μ^3 . Juste après la division, le volume des flagellés-fils est de 370 μ^3 , ce qui correspond pour le flagellé-mère à 740 μ^3 . La moyenne des deux volumes est de 550 μ^3 , ce qui correspond bien à la moyenne trouvée effectivement : 580 μ^3 . Dans les cultures plus anciennes, on peut trouver des flagellés plus petits dont le volume ne dépasse pas 230 μ^3 .

En présence de sulfamide à 1/5.000, dans les mêmes conditions, on constate que déjà après dix-neuf heures, les flagellés sont notablement plus volumineux que les flagellés moyens. Après quarante-huit et soixante-douze heures, on trouve des formes de 22/14 μ — volume 2.600 μ^3 — et même des formes subsphériques, de 20 et même 22 μ de diamètre — volume 4.200 à 5.500 μ^3 .

L'hypertrophie est, nous l'avons dit, précoce, puisqu'une

culture prélevée pendant la phase logarithmique de croissance, c'est-à-dire renfermant des flagellés d'un volume moyen de $530 \mu^3$, ensemencée en présence de sulfamide à 1/20.000 dans un milieu de pH 3,9 montre après vingt-deux heures des flagellés d'un volume moyen de $1.230 \mu^3$. Chacun de ces flagellés pourrait, en se divisant deux fois, donner 4 flagellés-fils de volume subnormal. Si nous considérons les flagellés de grande taille, nous voyons qu'ils pourraient subir 3 et même 4 divisions et donner ainsi 8 à 16 flagellés-fils de taille normale.

Nous pouvons ajouter que le rapport volume du noyau/volume total et volume du caryosome/volume total est sensiblement le même chez les flagellés normaux et chez les flagellés hypertrophiés. Il y a donc eu croissance protoplasmique et croissance nucléaire. En raison de l'abondance des réserves figurées dans le cytoplasme, surtout des grains d'amidon, il est difficile de mesurer avec précision le diamètre du noyau et nous n'avons pas pu suivre les variations du rapport nucléo-plasmatique.

Les auteurs qui ont observé les variations de taille des bactéries sous l'influence du sulfamide, ne semblent pas, nous l'avons noté, avoir attaché à l'hypertrophie une signification particulière. Lockwood a parlé de « formes de dégénérescence » et Luria a considéré que l'allongement des germes « n'avait rien de spécifique ». La taille des bactéries est évidemment très variable ; par exemple, au cours du cycle de croissance d'*E. coli*, il se produit une variation de la taille en relation avec les différentes phases de la courbe de croissance de la population bactérienne (Henrici, 1923-1928), et dans les cultures anciennes de bactéries, on trouve souvent des formes de dégénérescence hypertrophiées. La même remarque est valable pour les flagellés. Mais le fait que des causes variées, et d'ailleurs indéterminées, peuvent entraîner l'hypertrophie des micro-organismes, n'enlève pas sa signification à l'hypertrophie sulfamidique. Dans le cas qui nous occupe, l'hypertrophie des bactéries et des flagellés, dans les conditions où elle est observée, apparaît clairement comme le résultat de l'action du sulfamide.

On peut donc dire que la multiplication des organismes

et le développement des cultures sont arrêtés par le sulfamide ; mais on peut aller plus loin dans l'analyse de cet arrêt. Si la croissance était bloquée et non la division, les flagellés atteindraient la limite de taille inférieure de l'espèce. Si croissance et division étaient bloquées au même titre, les flagellés conserveraient leur taille moyenne normale. Le fait que la taille atteint et même dépasse les limites supérieures normales semble autoriser l'hypothèse que les mécanismes qui président à la division sont beaucoup plus sensibles à l'action du sulfamide que ceux qui sont responsables de la croissance, ou bien même que le sulfamide inhibe, non la croissance, mais uniquement la division.

On sait que la période de pré-division cellulaire est accompagnée de changements chimiques importants. Rapkine (1935) a mis en évidence, durant cette période, une dénaturation des protéines, accompagnée d'une augmentation de -SH protéique et de -SH soluble. Ce phénomène a été retrouvé chez certains ciliés par Chatton, Lwoff et Rapkine (1935).

La période de pré-division cellulaire, pendant laquelle sont réalisés les changements chimiques qui permettent et provoquent la division, semble sous la dépendance de réactions qui lui sont propres. Il paraît logique de supposer que l'une de ces réactions puisse être inhibée par le sulfamide.

II. — Action antisulfamide de l'acide *p*-aminobenzoïque en fonction du pH.

ACTION ANTISULFAMIDE DE L'ACIDE *p*-AMINOBENZOIQUE. — L'action antisulfamide de certains produits organiques, peptones, extraits de levures et de bactéries est connue grâce aux travaux de Stamp et de Green.

Woods et Fildes, Woods ont montré que l'acide *p*-aminobenzoïque peut remplacer le facteur antisulfamide de la levure, lequel est probablement l'acide *p*-aminobenzoïque lui-même ; celui-ci, à concentration moléculaire 5 à 20.000 fois inférieure à celle du sulfamide, supprime son activité inhibitrice sur le développement de streptocoque et d'*E. coli*.

L'acide *p*-aminobenzoïque est antisulfamide pour *Polyto-*

mella caeca : 1° L'addition de cette substance à un milieu de culture renfermant du sulfamide supprime l'action inhibitrice de celui-ci ;

2° L'addition d'acide *p*-aminobenzoïque à une culture inhibée par le sulfamide est suivie du départ de cette culture, même après trois semaines d'inhibition.

Dès nos premiers essais effectués en milieu neutre ou légèrement alcalin, nous avions été surpris de constater que l'acide *p*-aminobenzoïque n'était actif qu'à une concentration sensiblement équimoléculaire à celle du sulfamide, alors que, d'après Woods, il est pour les bactéries cinq à vingt mille fois plus actif environ. Un autre phénomène retenait notre atten-

TABLEAU I. — Activité de l'acide *p*-amino-benzoïque en relation avec la concentration du sulfamide.

NUMÉRO des tubes	SULFA- MIDE	ACIDE <i>p</i> -amino- benzoïque	C. S. C. P. A.	FLAGELLÉS PAR MILLIMÈTRE CUBE			
				Après 36 heures	Après 60 heures	Après 84 heures	Après 108 heures
1 . . .	0	0		1.500	> 3.000		
2 . . .	M/430	M/398	0,92	1.500	> 3.000		
3 . . .	M/430	M/590	1,2	1.500	> 3.000		
4 . . .	M/430	M/795	1,9	1.500	>> 3.000		
5 . . .	M/430	M/1.590	3,7	1.500	> 3.000		
6 . . .	M/430	M/3.180	7,4	100	200	300	> 2.000
7 . . .	M/430	M/3.980	9,2	15	50	100	1.500
8 . . .	M/430	0	∞	15	15	15	15
9 . . .	M/4.300	0		1.500	> 3.000		
10 . . .	M/4.300	M/3.980	0,92	1.500	> 3.000		
11 . . .	M/4.300	M/5.900	1,2	1.500	> 3.000		
12 . . .	M/4.300	M/7.7950	1,9	1.500	> 3.000		
13 . . .	M/4.300	M/15.900	3,7	1.500	> 3.000		
14 . . .	M/4.300	M/31.800	7,4	100	800	1.500	> 3.000
15 . . .	M/4.300	M/39.800	9,2	15	100	500	> 2.000
16 . . .	M/4.300	0	∞	15	15	15	15

Milieu à l'asparagine éthanol et à l'acétate d'ammonium, de pH constant égal à 7,0. concentration initiale en flagellés : 4 par millimètre cube. $\frac{C. S.}{C. P. A.}$ concentration moléculaire de sulfamide sur concentration moléculaire d'acide *p*-aminobenzoïque; ce rapport pour la Concentration minimum d'acide *p*-aminobenzoïque neutralisant l'effet du sulfamide donne le chiffre de l'activité (en caractère gras). Les chiffres donnés dans la colonne « heures après ensemencement » correspondent aux concentrations approximatives en flagellés par millimètre cube.

tion : à la suite d'un changement de milieu, l'activité de l'acide *p*-aminobenzoïque avait varié notablement. Très rapi-

dément nous nous rendions compte que ces différences d'activité étaient en relation avec les variations de pH du milieu. Ceci nous a amenés à déterminer l'activité antisulfamide de l'acide *p*-aminobenzoïque en fonction de la concentration en ions H du milieu.

Technique. — On prépare une série de tubes renfermant 5 cent. cubes de milieu ; le premier tube sert de témoin, le dernier tube est additionné de sulfamide. Les autres tubes sont additionnés de sulfamide et d'acide *p*-aminobenzoïque. L'ensemencement a lieu avec des flagellés prélevés à la phase logarithmique de croissance dans un milieu identique et de même pH que les milieux ensemencés. La concentration initiale en flagellés varie de 2,6 à 5 par millimètre cube. Dans ces conditions, à 22°, le premier tube témoin atteint une densité de 1.500 flagellés par millimètre cube en trente-six à quarante-huit heures ; le dernier tube ne montre pas de développement. Les tubes suivants ou bien se comportent comme le témoin si la concentration en acide *p*-aminobenzoïque est suffisante, ou bien montrent un retard de la croissance plus ou moins considérable.

Nos résultats seront exprimés en « activité » de l'acide *p*-aminobenzoïque. Cette « activité » représente le rapport concentration moléculaire du sulfamide/concentration moléculaire minimum de l'acide *p*-aminobenzoïque nécessaire pour supprimer l'effet du sulfamide. Si ce rapport est égal à 1,

TABLEAU II. — Expérience de détermination de l'activité de l'acide *p*-aminobenzoïque.

NUMÉRO des tubes	SULFAMIDE	ACIDE <i>p</i> -amino- benzoïque	C. S. C. P. A.	FLAGELLÉS PAR MILLIMÈTRE CUBE		
				Après 46 heures	Après 51 heures	Après 71 heures
1	0	0		700	1.500	> 3.000
2	M/430	M/318.200	740	700	1.500	> 3.000
3	M/430	M/395.600	920	700	1.500	> 3.000
4	M/430	M/516.000	1.200	700	1.500	> 3.000
5	M/430	M/636.400	1.480	700	1.500	> 3.000
6	M/430	M/795.000	1.850	100	200	1.000
7	M/430	0	∞	20	20	20

Milieu à l'asparagine acétate de Na, de pH 3,72. Concentration initiale 2,5 flagellés par millimètre cube. Pour le reste, même légende que le tableau I.

ceci veut dire que le milieu de culture doit renfermer une quantité équimoléculaire de sulfamide et d'acide *p*-amino-

benzoïque pour que le développement de la culture se fasse comme dans le tube témoin. Si ce rapport est égal à 1.200, cela veut dire qu'une molécule d'acide *p*-aminobenzoïque neutralise l'effet de 1.200 molécules de sulfamide.

Woods a montré que, pour le streptocoque, la proportion d'acide *p*-aminobenzoïque nécessaire pour neutraliser le sulfamide est indépendante de la concentration de celui-ci. L'activité de l'acide *p*-aminobenzoïque est donc constante. C'est ce que nous avons vérifié pour *Polytomella* (voir tableau I). On voit d'après ce tableau que l'activité était la même — 3,7 — pour des concentrations de sulfamide M/430 et M/4.300. Pour que ces expériences conservent leur valeur, il faut que la concentration en sulfamide soit suffisante pour assurer un

TABLEAU III. — *Expérience de détermination de l'activité de l'acide *p*-aminobenzoïque.*

NUMÉRO des tubes	SULFAMIDE	ACIDE <i>p</i> -amino- benzoïque	C. S. C. P. A.	FLAGELLÉS par millimètre cube	
				Après 42 heures	Après 66 heures
1.	0	0		1.500	≥ 3.000
2.	M/430	M/198	0,46	1.500	≥ 3.000
3.	M/430	M/396	0,92	1.500	≥ 3.000
4.	M/430	M/792	1,8	100	400
5.	M/430	M/1.580	3,6	50	100
6	M/430	0	∞	10	19

Milieu à l'asparagine acétate de Na, de pH 8,5. Concentration initiale : 4,3 flagellés par millimètre cube. Pour le reste, même légende que pour le tableau I.

retard d'au moins quatre jours. Ainsi est éliminée l'interférence du phénomène d'adaptation qui empêcherait de discriminer dans le départ de la culture ce qui revient en propre à l'acide *p*-aminobenzoïque introduit dans le milieu. Pratiquement, nous avons toujours utilisé le sulfamide à une concentration M/430. Les tableaux II et III montrent les résultats de deux expériences effectuées à pH 8,5 et 3,7. L'activité de l'acide *p*-aminobenzoïque à pH 8,5 est de 1 ; elle est de 1.480 à pH 3,7. Bien entendu avant chacune des expériences on déterminait par une expérience d'orientation l'activité

approximative de l'acide *p*-aminobenzoïque aux pH envisagés. Le tableau IV donne les résultats de 53 expériences effectuées à des pH différents et pour lesquelles nous n'avons pas cru utile de donner un protocole détaillé.

Nous avons vérifié pour des milieux de pH 6,9, 5,9, 4,9

TABLEAU IV. — Activité du l'acide *p*-aminobenzoïque en fonction du pH. Résultat des expériences.

pH	ACTIVITÉ	pH	ACTIVITÉ	pH	ACTIVITÉ	pH	ACTIVITÉ
9,40	1,2	6,50	6,5	4,30	370	3,60	1 480
8,85	0,92	6,10	9,3	4,30	370	3,50	1.200
8,50	0,92	5,95	18,5	4,40	463	3,50	1.200
8,15	0,92	5,95	32	4,00	740	3,40	925
8,00	1,2	5,88	18,5	4,00	740	3,20	925
7,40	1,85	5,50	31	4,00	740	3,10	740
7,00	4,5	5,10	93	3,96	925	3,02	920
7,00	4,5	5,10	93	3,96	925	3,02	740
7,00	3,7	4,94	140	5,72	1.200	2,85	740
7,00	3,7	4,94	130	3,70	1.200	2,60	370
6,90	7,4	4,90	140	3,70	1.480	2,60	370
6,90	7,0	4,30	600	3,70	925	2,55	740
6,80	3,7	4,30	640	3,70	925	2,25	460
						2,25	460

Les résultats des expériences préliminaires d'orientation n'ont pas été donnés.

et 3 que les résultats sont identiques, que l'on introduise dans le milieu de l'acide *p*-aminobenzoïque ou du *p*-aminobenzoate de sodium, résultat d'ailleurs prévisible, étant donné les faibles concentrations de ces substances par rapport à celles des autres constituants du milieu. La figure 3 représente la courbe de l'activité de l'acide *p*-aminobenzoïque en fonction du pH. Cette courbe comprend trois parties :

1° Une partie correspondant à des pH compris entre 9,2 et 7,55 dans laquelle l'activité de l'acide *p*-aminobenzoïque est constante et égale à 1 ;

2° Une partie comprise entre pH 7,55 et 3,65 dans laquelle l'activité passe de 1 à 1.200 ;

3° Une partie comprise entre pH 3,65 et 2,25 dans laquelle l'activité décroît de 1.200 à 380.

ABSENCE D'INFLUENCE DE LA CONSTITUTION DU MILIEU. — L'activité de l'acide *p*-aminobenzoïque s'est montrée iden-

tique à pH constant dans des milieux à l'acétate d'ammonium, à l'asparagine-éthanol, dans un mélange de ces deux milieux ou dans un milieu à l'asparagine-acétate de sodium. A pH égal, les résultats sont identiques aussi, que le milieu

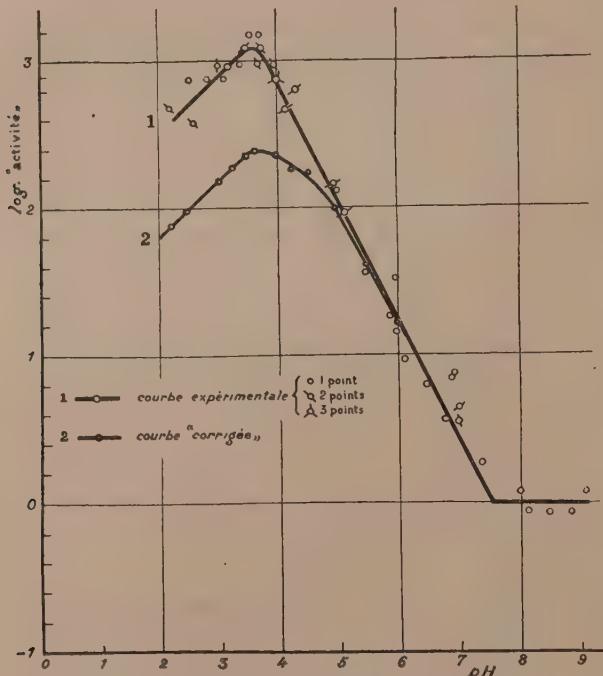


FIG. 3. — « Activité » antisulfamide de l'acide *p*-aminobenzoïque pour *Polytomella cæca* en fonction du pH.

En abscisses : pH. En ordonnées : log. de l'activité; 1, courbe expérimentale; 2, courbe corrigée d'après la courbe d'action du sulfamide en fonction du pH.

soit acidifié par les acides sulfurique, chlorhydrique ou acétique.

CORRECTION DE LA COURBE EXPÉRIMENTALE. — Nous avons noté qu'il faudrait beaucoup plus de sulfamide à pH 4 qu'à pH 7 pour inhiber le développement de *Polytomella*. Autrement dit, une même quantité de sulfamide exerce une action moindre à pH 4 qu'à pH 7. La courbe de l'activité de l'acide *p*-aminobenzoïque doit donc être corrigée en tenant compte des variations de l'activité du sulfamide.

L'activité du sulfamide en fonction du pH a donc été établie. On a pris comme mesure le chiffre de la concentration limite supérieure de sulfamide qui permet en quarante-deux heures un développement égal à celui de la culture témoin. La courbe obtenue est représentée sur la figure 4.

On voit d'après cette courbe qu'à pH 7 il y a un développement normal en présence de 4 milligrammes de sulfamide par litre, alors qu'à pH 3,5 le développement reste normal jusqu'à une concentration de 20 milligrammes. Ceci veut dire que l'action du sulfamide est cinq fois plus faible à pH 3,5 qu'à

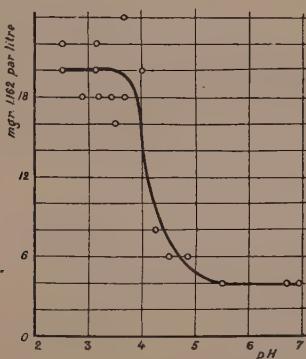


FIG. 4. — Action du sulfamide sur *Polytomella cæca* en fonction du pH.
En abscisses: pH. En ordonnées: concentration maximum du sulfamide en milligrammes par litre qui permet en quarante heures un développement identique à celui du témoin.

pH 7. Pour obtenir le chiffre réel de l'activité de l'acide *p*-aminobenzoïque à pH 3,5, par rapport à son activité à pH 7, il faudra donc diviser par 5 la valeur trouvée pour pH 3,5. La courbe 2 de la figure 3 représente la courbe de l'activité corrigée de l'acide *p*-aminobenzoïque en fonction du pH.

INTERPRÉTATION DE LA COURBE D'ACTIVITÉ DE L'ACIDE *p*-AMINOBENZOIQUE. — On pouvait envisager plusieurs interprétations de cette courbe : 1° le pH pourrait agir directement sur les flagellés en provoquant par exemple une modification de la membrane dont la perméabilité maximum correspondrait

TABLEAU V. — Activité de l'acide *p*-aminobenzoïque en fonction du pH d'après la courbe expérimentale.

pH	ACTIVITÉ	ACTIVITÉ corrigée	ACTIVITÉ p. 100	pH	ACTIVITÉ	ACTIVITÉ corrigée	ACTIVITÉ p. 100
9,10	1	1	0,4	4,25	457	187	73
7,50	1	1	0,4	4,00	724	224	88
7,00	3	3	1,2	3,65	1.200	245	96
6,50	6,7	6,7	2,6	3,50	1.150	230	90
6,00	19	19	7,5	3,25	955	191	75
5,50	41	41	16,1	3,00	759	153	60
5,00	110	96	38	2,50	479	96	38
4,50	288	169	66	2,25	380	76	30

Dans la deuxième colonne, les chiffres représentent l'activité d'après la courbe expérimentale. Dans la troisième colonne on a donné l'activité corrigée en tenant compte des variations de l'action du sulfamide en fonction du pH. Les chiffres donnés dans la quatrième colonne représentent le pourcentage de l'activité, l'activité maximum étant arbitrairement fixée à 96 (chiffre du pourcentage de l'acide non dissocié à son point isoélectrique). Les valeurs correspondant au point isoélectrique sont en caractères gras.

à pH 3,63 ; 2° il pourrait s'agir aussi d'une action directe sur l'enzyme intervenant dans le métabolisme de l'acide *p*-aminobenzoïque, enzyme dont l'existence a été prévue par Fildes et Woods ; 3° on pouvait également considérer l'hypothèse dans laquelle les variations de l'activité auraient été sous la dépendance des variations de la vitesse de multiplication des flagellés en fonction du pH. Quoique nous n'ayons pas effectué de mesures de cette vitesse de multiplication, nous avons opéré dans des conditions telles que nous pouvons être certains qu'entre pH 2,25 et pH 9,20 cette vitesse ne varie pas de plus de 50 p. 100. Si donc il y a eu différence de vitesse, ceci est pratiquement négligeable par rapport aux énormes variations de l'activité. Une activité aussi variable nous paraît également difficilement compatible avec les deux premières hypothèses envisagées : action sur la membrane, action sur un enzyme. C'est une autre interprétation qui a retenu notre attention.

L'acide *p*-aminobenzoïque est une substance amphotère ; on pouvait donc se demander : a) si le maximum de son activité ne correspondrait pas à son point isoélectrique ; b) si la courbe de l'activité ne correspondrait pas à la courbe de dissociation.

LE POINT ISOÉLECTRIQUE DE L'ACIDE *p*-AMINOBENZOIQUE. — Divers auteurs (Michaelis et Davidsohn, 1911; Scudder, 1914; Clark, 1928) admettent comme constantes de dissociation les chiffres de 5,17 (pKa) et 2,36 (pKb), ce qui donne un pI de 3,77. Bjerrum (1923) donne pour les constantes 4,80 et 1,98, ce qui correspond à un pI de 3,39. La moyenne des valeurs admises par les différents auteurs est donc 3,58. La différence entre les diverses valeurs du pI de l'acide *p*-aminobenzoïque et la valeur du pH correspondant à l'activité maximum de cette substance (3,65) sont les suivantes :

- + 0,12 avec le chiffre de Michaelis et Davidsohn ;
- 0,26 avec le chiffre de Bjerrum ;
- 0,07 avec la moyenne de ces chiffres.

Dans la limite d'erreur des déterminations il y a donc concordance parfaite entre les deux valeurs. Nous tenons à ajouter que la courbe d'activité de l'acide *p*-aminobenzoïque et l'existence d'un maximum à pH 3,65 avaient été établies avant que nous ayons pris connaissance du chiffre du point isoélectrique de cet acide.

Si cette coïncidence n'est pas l'effet d'une concordance fortuite, cela signifie qu'il y a une relation entre la dissociation et l'activité.

LA COURBE DE DISSOCIATION DE L'ACIDE *p*-AMINOBENZOIQUE. — Si a est la dissociation, $1-a$ le résidu de dissociation, pKa et pKb les constantes de dissociation, les relations entre le pH et la dissociation sont données par la formule

$$pH = pK + \log \frac{a}{1-a}$$

La courbe du pourcentage d'acide non dissocié $[(1-a) \times 100]$ en fonction du pH, calculée d'après cette formule, est représentée sur la figure 5. Notons que la formule utilisée n'est valable que pour des solutions relativement concentrées d'acide ; les concentrations utilisées ont varié entre M/430 à pH 7,5 et M/316.000 à pH 3,7. Si la dilution n'affecte pas le point isoélectrique, elle affecte cependant la courbe de dissociation. Mais étant donné la complexité du milieu de culture, il est difficile de calculer avec précision la valeur exacte de

la dissociation pour chacune des dilutions. Nous avons donc utilisé la courbe théorique correspondant à des solutions concentrées. Sur cette même figure, nous avons représenté la courbe du pourcentage d'activité de l'acide *p*-aminobenzoïque. Pour que les deux courbes soient comparables, nous avons multiplié la valeur de l'activité corrigée par 0,392 afin que

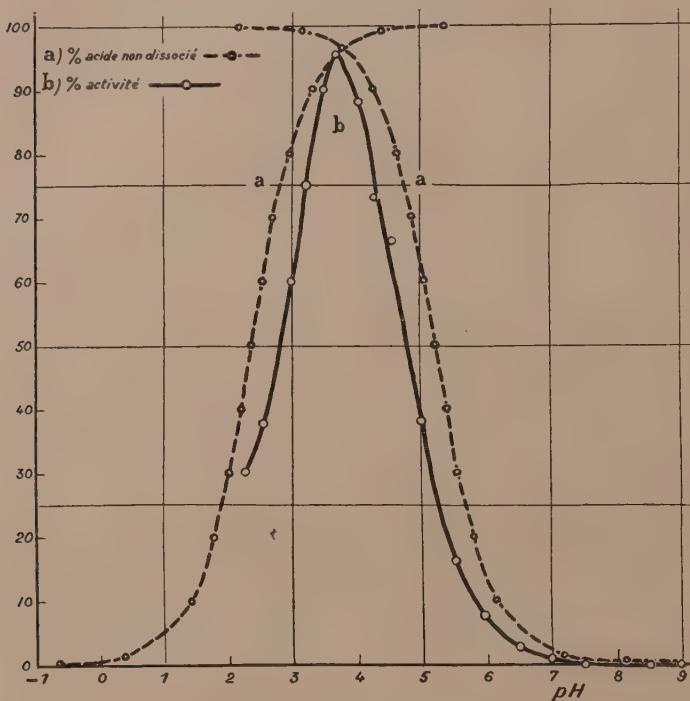


FIG. 5. — Courbe de l'acide *p*-aminobenzoïque non dissocié et courbe de l'activité corrigée.

En abscisses : pH. En ordonnées : *a*, pourcentage d'acide non dissocié; *b*, pourcentage de l'activité corrigée. Pour la commodité de la comparaison le maximum de l'activité a été fixé à 96, pourcentage de l'acide non dissocié au point isoélectrique. (Pour obtenir l'activité réelle, multiplier par 2,55.)

l'activité maxima correspond à 96, pourcentage de l'acide non dissocié au point isoélectrique (voir tableau V). On voit que les deux courbes ont la même allure générale, les divergences maxima correspondent à des différences de pH inférieures à 0,5 unités.

DISCUSSION.

L'étude de l'activité antisulfamide de l'acide *p*-aminobenzoïque pour *Polytomella* en fonction du pH nous conduit donc à la conclusion suivante : l'activité de la forme dissociée est très faible, une molécule d'acide dissociée neutralisant une molécule de sulfamide ; l'activité de la forme non dissociée est plus élevée, une molécule d'acide neutralise environ 245 molécules de sulfamide. L'activité maxima au point isoélectrique correspond au minimum (4 p. 100) de dissociation. Dans les régions intermédiaires, courbe de dissociation et courbe d'activité présentent une allure voisine. On pourrait conclure, si les variations de l'activité traduisent, comme cela est probable, des différences de vitesse de pénétration, que la forme non dissociée pénètre dans le flagellé deux cent quarante-cinq fois plus vite que la forme ionisée.

Comment cette conclusion s'intègre-t-elle dans l'ensemble des données sur la pénétration dans les cellules en fonction de la dissociation ?

On sait depuis longtemps (Traube, Giemsa, Schaumann, Uspenskaja, Crane, Mayeda, Roskin et Dune) que la toxicité de la quinine pour divers Ciliés (*Paramaecium*, *Colpidium*, *Spirostomum*) augmente avec le pH du milieu de culture. Cette variation a été mise en relation avec le degré de dissociation de la quinine. Mais ces expériences doivent être interprétées avec beaucoup de prudence. Roskin et Dune ont en effet montré que l'effet du pH est inversé si les Paraméciés ont vécu trois à quatre jours en présence de saccharate de fer qui s'accumule dans le protoplasme sous forme colloïdale.

Cependant quelques rares expériences ont établi l'existence d'une relation entre la perméabilité cellulaire et la dissociation.

Osterhout étudiant la pénétration de H_2S dans le suc cellulaire de l'algue *Valonia macrophysa*, montre que la courbe de concentration en soufre du suc cellulaire coïncide exactement avec la courbe du résidu de dissociation de H_2S . Osterhout conclut que H_2S n'entre que peu ou pas sous forme d'ion dans le suc cellulaire, mais pénètre seulement sous

forme de molécule non dissociée. Il en est de même d'après Osterhout pour CO_2 .

Dans l'édition française du Traité de Gellhorn sur la perméabilité, J. Régnier (1936) résume ainsi la question (p. 139) : « Malgré que nous ne connaissons pas encore le mécanisme selon lequel, ou plutôt la forme selon laquelle les acides et les bases pénètrent dans la cellule, on peut dire que grâce à ces expériences — (celles d'Osterhout) — des données assez précises ont été obtenues. En effet, on voit que les acides fortement dissociés, aussi bien que les bases, ne pénètrent que très difficilement ou que, s'ils pénètrent, c'est au moins en partie parce qu'ils provoquent des lésions des cellules. On voit par contre que les acides organiques et les bases, quand ils sont plus faiblement dissociés, pénètrent bien plus vite dans les cellules. »

Nos expériences sur *Polytomella* nous conduisent, pour ce qui concerne l'acide *p*-aminobenzoïque, à une conclusion identique (1).

ACTIVITÉ DE L'ACIDE *p*-AMINOBENZOIQUE EN RELATION AVEC SA SOLUBILITÉ. — Une autre hypothèse doit cependant être envisagée : la solubilité de l'acide *p*-aminobenzoïque est fonction de la dissociation ; elle est minimum au point isoélectrique. On pouvait donc se demander si l'activité de l'acide n'était pas en raison inverse de sa solubilité, c'est-à-dire si cette activité n'était pas fonction d'un coefficient de partage entre le milieu et le flagellé.

Nous avons déterminé la solubilité dans l'eau à 22° de l'acide *p*-aminobenzoïque à divers pH. La courbe de « solubilité relative » (rapport de la solubilité à pH 9/solubilité à pH donné) correspond dans l'ensemble à la courbe de dissociation et à la courbe d'activité. Plutôt que d'admettre que l'activité de l'acide *p*-aminobenzoïque est en raison inverse de sa solubilité, il nous semble plus logique de conclure que la concordance des courbes de solubilité relative et d'activité

(1) Nous rappelons que l'activité antiseptique de l'acide benzoïque est beaucoup plus considérable dans des milieux acides que dans des milieux neutres (v. à ce sujet W. V. Cruess et P. H. Richert, 1929).

de l'acide *p*-aminobenzoïque est due à ce que les deux phénomènes sont fonction de la dissociation.

ETUDE DU COMPORTEMENT DE *Escherichia coli* ET D'*Aspergillus niger*. — Il pouvait être intéressant de rechercher si ce phénomène se retrouvait chez d'autres micro-organismes, et nous avons examiné à ce point de vue *Escherichia coli* et *Aspergillus niger*.

Escherichia coli-*E. coli*, en milieu synthétique de Fildes, est sensible au sulfamide (Woods, 1940) ; l'action du sulfamide est neutralisée par l'acide *p*-aminobenzoïque à concentration moléculaire cinq à vingt-cinq mille fois inférieure (Woods, 1940). Ces constatations expliquent l'échec des premiers expérimentateurs, qui n'avaient pas réussi à mettre en évidence l'action *in vitro* du sulfamide sur *E. coli* dans des milieux ordinaires : eau peptonée, bouillon. Ces milieux renferment, en effet, une notable quantité d'antisulfamide. La peptone Martin, résultant de l'hydrolyse pepsique de l'estomac de porc, et la peptone Vaillant 3 C (peptone de muscle) contiennent, d'après nos expériences, une quantité d'antisulfamide équivalant à 2 grammes p. 1.000 d'acide *p*-aminobenzoïque. Ceci veut dire qu'une solution de peptone à 2 p. 100 contient une proportion d'antisulfamide équivalant à de l'acide *p*-aminobenzoïque à 1 p. 25.000, c'est-à-dire capable de neutraliser l'effet du sulfamide à concentration supérieure à 50 p. 100.

Nos essais sur *E. coli* ont été effectués dans le milieu suivant :

	GRAMMES
Sulfate d'ammoniaque	1
Phosphate monopotassique	2
Chlorure de K	0,5
Sulfate de Mg	0,05
Lactate de Na	10
Eau bidistillée	1.000
Soude pour pH 7,4.	

Après stérilisation on ajoute par tube de 10 cent. cubes de milieu I goutte de la solution suivante stérilisée à part :

	GRAMMES
Citrate ferrique	1
Chlorure de Ca	1
Eau bidistillée	1.000

La souche « Monod » que nous avons utilisée, entretenue dans ce milieu, montre souvent, après plusieurs repiquages, des formes « rough » de sensibilité inégale au sulfamide et à l'acide *p*-aminobenzoïque. Il nous a paru préférable de conserver la souche sur gélose ordinaire et de lui faire subir, vingt-quatre heures avant l'ensemencement, un passage en milieu synthétique. Si l'on ensemence 10.000 bactéries dans 10 cent. cubes de milieu de pH 7,4 on n'obtient jamais, en présence de sulfamide à 1 p. 2.000, de culture visible à l'œil nu en trois à cinq jours, alors que la culture est notable dans les tubes témoins après vingt-quatre heures à 37°. Pour des concentrations en sulfamide de 1 p. 20.000 et 1 p. 10.000, le retard sur les tubes témoins ne dépasse guère vingt-quatre à quarante-huit heures.

À pH 6,5, il faut environ deux fois plus de sulfamide pour produire la même action qu'à pH 7,4.

Conformément à la conclusion de Woods, l'acide *p*-aminobenzoïque à concentration moléculaire dix mille fois inférieure à celle du sulfamide supprime son effet inhibiteur. À pH 6,5 et 5,5 il faut environ deux fois moins d'acide *p*-aminobenzoïque pour produire le même effet. Mais, comme le sulfamide est deux fois moins actif en milieu acide qu'à pH 7,4, ceci veut dire que l'acide *p*-aminobenzoïque possède la même activité réelle à pH 6,5 qu'à pH 7,4.

Aspergillus niger. — On sait qu'*Aspergillus niger* est très sensible au sulfamide (Fourneau, M. et M^{me} Tréfouël, Nitti, Bovet, 1936). On sait aussi qu'*Aspergillus niger* supporte, contrairement à *E. coli*, des variations considérables de pH. On pouvait donc *a priori* considérer cette moisissure comme un matériel favorable pour les recherches que nous désirions entreprendre. Nous avons utilisé la souche d'*Aspergillus niger* « N » de la collection du Service des Fermentations ; le milieu de Czapeck a été employé :

	GRAMMES
Sulfate d'ammonium	5
Phosphate monopotassique	1
Chlorure de K.	0,5
Sulfate de Mg.	0,5
Sulfate ferreux	0,04
Sulfate de Zn.	0,01
Eau bidistillée.	1.000

Après stérilisation, on ajoute une solution stérile de glucose, de façon à obtenir une concentration de 40 grammes p. 1.000. L'ensemencement est pratiqué avec une suspension de spores recueillies avec l'anse de platine sur la surface d'un milieu gélosé ensemencé sept jours auparavant. Dans ces conditions, un voile se produit dans le milieu synthétique en vingt-quatre heures à 37°. Les résultats ont été notés trente heures après l'ensemencement.

Dans un milieu de pH 5, le sulfamide entraîne des retards, par rapport aux témoins, d'un mois pour une concentration de 1 p. 100, cinq à sept jours pour 1 p. 1.000 et vingt-quatre à quarante-huit heures pour 1 p. 10.000.

Nous avons commencé par déterminer à différents pH la concentration minimum de sulfamide donnant un retard de vingt-quatre heures par rapport aux témoins. Ces concentrations sont les suivantes :

pH 7,1.	1 p. 200.000
pH 5,8.	1 p. 20.000
pH 4,6.	1 p. 10.000
pH 3,7.	1 p. 5.000

À pH 3,7 il faut donc quarante fois plus de sulfamide qu'à pH 7,1 pour produire le même effet.

L'activité de l'acide *p*-aminobenzoïque en fonction du pH en présence de sulfamide à 1 p. 1.000 est également variable. Elle est de 10 à pH 7,1 et de 2.000 à pH 3,7. Mais, comme le sulfamide est quarante fois moins actif à pH 3,7 qu'à pH 7,1, le rapport de l'activité réelle corrigée de l'acide *p*-aminobenzoïque à ces pH n'est pas de 1 à 200, mais de 1 à 5, différence très faible comparativement aux valeurs 1 à 245 obtenues pour *Polytomella*.

Ces expériences montrent en tout cas que le sulfamide, aussi bien pour *E. coli* que pour *Aspergillus niger* et pour *Polytomella*, est moins actif en milieu acide qu'en milieu neutre ou alcalin. Elles montrent également que l'activité de l'acide *p*-aminobenzoïque varie considérablement avec les organismes, puisqu'en milieu neutre elle est de 1 pour *Polytomella*, de 10 pour *Aspergillus niger* et de 40.000 pour *E. coli*. On voit aussi que l'influence du pH sur l'activité de

l'acide *p*-aminobenzoïque dépend de l'espèce considérée. Cette influence est très marquée pour *Polytomella*, pratiquement nulle pour *E. coli* et *Aspergillus niger*.

Conclusions.

1° Le flagellé *Polytomella caeca* s'est révélé sensible au sulfamide (1162 F), c'est-à-dire qu'il se comporte comme un végétal.

2° A pH 4 il faut environ cinq fois plus de sulfamide qu'à pH 7 pour produire le même effet sur les flagellés.

3° Le sulfamide ne tue pas les flagellés, mais inhibe le développement des cultures. Alors que dans les conditions de culture habituelles il s'écoule environ trois heures et demie à quatre heures entre deux divisions, les cultures peuvent rester bloquées, en présence de sulfamide, pendant trois semaines au moins, c'est-à-dire pendant une durée qui représente cent vingt fois le temps séparant deux divisions. Le temps de latence varie suivant le pH du milieu et la concentration en sulfamide.

4° Une culture normale de *Polytomella* se développe vers le quinzième jour pour une concentration de 70 à 80 milligrammes de 1162 F par litre ; une culture « adaptée » par trois passages successifs se développe déjà, après ce même laps de temps, pour une concentration de 300 milligrammes par litre. L'augmentation de la tolérance pourrait être due à une augmentation de la production d'antisulfamide.

5° L'action antagoniste de l'acide *p*-aminobenzoïque s'exerce sur *Polytomella* comme elle s'exerce sur les bactéries.

Non seulement l'acide *p*-aminobenzoïque empêche l'action inhibitrice du sulfamide de se manifester, mais il permet le départ de la multiplication de cultures bloquées depuis plusieurs semaines.

6° Les flagellés soumis à l'influence du sulfamide restent donc vivants et aptes à se reproduire, soit lorsqu'ils sont adaptés, soit lorsque l'action du sulfamide est contre-balancée par celle de l'acide *p*-aminobenzoïque.

7° Les flagellés dont la multiplication est inhibée par le sulfamide ont un volume quatre à seize fois supérieur à celui

des flagellés moyens normaux. Cette constatation, rapprochée d'observations analogues faites par divers auteurs sur les bactéries, conduit à l'hypothèse que le sulfamide inhibe, non la croissance, mais seulement la division des micro-organismes.

8° « L'activité » de l'acide *p*-aminobenzoïque est de 1 de pH 9,10 à 7,55 ; elle augmente jusqu'à 1.200 de pH 7,6 à 3,65, pour retomber à 380 à pH 2,25.

9° « L'activité » de l'acide *p*-aminobenzoïque est maxima à son point isoélectrique. La courbe de l'activité en fonction du pH correspond à la courbe de dissociation.

10° L'hypothèse est envisagée que la forme non dissociée de l'acide *p*-aminobenzoïque pénètre beaucoup plus rapidement dans les flagellés que la forme ionisée.

11° *E. coli* et *Aspergillus niger* sont, comme *Polytomella*, moins sensibles au sulfamide en milieu acide qu'en milieu neutre, mais l'activité de l'acide *p*-aminobenzoïque pour ces organismes ne subit pas de variation notable avec l'acidification.

BIBLIOGRAPHIE

BJERRUM. *Zeit. f. physik. Chem.*, **104**, 1923, p. 147.
 CHATTON (E.), LWOFF (A.) et RAPKINE (L.). *C. R. Soc. Biol.*, **106**, 1931, p. 626.
 CLARK (W. M.). *Determination of Hydrogen ions*, 3^e éd., Londres, 1928.
 CRUESS (W. V.) et RICHERT (P. H.). *Jl. of Bact.*, **17**, 1929, p. 363.
 DOOREN DE JONG (E.). *Bijdrage tot de Kennis van het mineralisatieproces*, Rotterdam, 1926.
 FILDES (P.). *Brit. Jl. exp. Path.*, **21**, 1940, p. 67; *Lancet*, 1940, p. 955.
 FOURNEAU (E.), M. et M^{me} TRÉFOUËL, NITTI et BOVET. *C. R. Soc. Biol.*, **122**, 1936, p. 652.
 GELLHORN (E.) et RÉGNIER. *La perméabilité en physiologie et en pathologie générale*, Paris, 1936.
 GREEN (H. N.). *Brit. Jl. exp. Path.*, **21**, 1940, p. 38.
 KIMMIG (J.). *Klin. Woch.*, **20**, 1941, p. 235.
 LOCKWOOD (John S.). *Jl. of Immun.*, **35**, 1938, p. 155.
 LURIA (S.). *C. R. Soc. Biol.*, **131**, 1939, p. 429.
 LWOFF (A.). *Ces Annales*, **66**, 1941, p. 407.
 MC INTOSH (J.) et WHITBY (L. E. H.). *Lancet*, **236**, 1939, p. 431.
 MICHAËLIS et DAVIDSOHN. *Bioch. Zeit.*, **30**, 1911, p. 143.
 NITTI, PHILIPPE et BOVET. *C. R. Soc. Biol.*, **131**, 1939, p. 70.
 OSTERHOUT. *Jl. gen. Phys.*, **8**, 1925, p. 131.
 QUASTEL (J. H.) et WOOLDRIDGE (W. R.). *Bioch. Jl.*, **22**, 1928, p. 689.
 RÉGNIER. V. Gellhorn.

RAPKINE (L.). *Ann. Physiol. et Physicochimie Biol.*, **7**, 1931, p. 382.
ROSKIN et DUNE. *Ark. f. Protist.*, **66**, 1929, p. 346.
SCUDDER. *The electrical conductivity and Ionisation constants of organic compounds*, New-York, 1914.
STAMP (T. C.). *Lancet*, **237**, 1939, p. 10.
THUNBERG (T.). *Bioch. Zeit.*, **258**, 1933, p. 48.
WOODS (D.). *Brit. Jl. exp. Path.*, **21**, 1940, p. 84.
WOODS (D.) et FILDES (P.). *Chemistry and Industry*, 1940, p. 133.

LES SPIROCHÈTES COMMENSAUX DE L'HOMME

[DEUXIÈME MÉMOIRE] (1)

par P. SÉGUIN et R. VINZENT.

Dans un premier mémoire (1), nous avons indiqué nos méthodes d'isolement et de culture des spirochètes commensaux de l'homme ; nous avons également donné la description détaillée de *Sp. microdentium* Noguchi. Dans ce second mémoire, nous allons étudier, en suivant le même plan que pour *Sp. microdentium*, quatre autres espèces buccales :

Sp. ambigua (nov. sp.) ;
Sp. comandoni (nov. sp.) ;
Sp. skoliadonta, Hoffmann ;
Sp. trimerodonta, Hoffmann.

Tous ces spirochètes appartiennent, comme *Sp. microdentium*, au groupe jusqu'ici mal défini des petites espèces buccales. Ce ne sont pas les moins intéressants : ainsi que nous avons pu l'établir, ce sont ceux que l'on rencontre de préférence dans les lésions putrides et gangrénées des voies respiratoires où ils apparaissent d'ordinaire plus nombreux que les spirochètes moyens (*Sp. macrodentium*, *Sp. orogyrata*) ou que les grands (*Sp. buccalis*). Ce sont également ceux qui prédominent dans les lésions expérimentales produites chez les animaux (cobaye, lapin) à la suite d'inoculations de complexes microbiens d'origine bucco-dentaire.

Avant d'entreprendre nos descriptions, nous croyons utile d'attirer l'attention sur une particularité bactériologique frappante qui ne manquera pas d'être remarquée par ceux qui poursuivront l'étude du sujet qui nous occupe. Tant que l'on ne dispose que d'un petit nombre de souches de spirochètes, on est facilement porté, par des différences minimes de morphologie ou de biologie, à considérer chaque souche nouvellement isolée comme appartenant à une espèce dis-

(1) Voir ces *Annales*, 61, 1938, p. 255.

tincte. On pourrait ainsi se trouver conduit à multiplier à l'infini les groupes de ces organismes, pour le plus grand dommage du travail systématique. Si l'on s'astreint, au contraire, à isoler un grand nombre de souches avant de procéder à des coupures spécifiques, on s'aperçoit qu'il est possible de grouper des formes au premier abord un peu disparates, en tenant compte d'un ensemble suffisamment stable et concordant de caractères communs. Sans doute, plaira-t-on quelques formes un peu aberrantes dans chacun des groupes ainsi définis, mais, dans son ensemble, la classification sera aussi nettement établie qu'elle l'est d'habitude pour les autres groupements bactériens.

Nous devons encore mettre en garde le spécialiste contre un deuxième écueil. Il arrive fréquemment que des cultures de spirochètes paraissent pures alors que les organismes hélicoïdaux qu'elles contiennent appartiennent à deux ou plusieurs espèces différentes. De telles cultures présentent des caractères particuliers et peuvent en imposer pour une espèce nouvelle. Plusieurs fois nous avons failli nous laisser induire en erreur par des difficultés de cette nature. Nous en donnerons des exemples.

I. — *Sp. ambigua* (nov. sp.), 1936.

Nous décrivons sous ce nom un petit spirochète de la flore buccale et pulmonaire. Très voisin de *Sp. microdentium* par sa morphologie, il s'en distingue aisément par l'ensemble de ses caractères culturaux et biochimiques.

HABITAT.

La description de cette espèce nouvelle repose sur l'étude de 8 souches dont nous indiquons ci-dessous l'origine. Six de ces souches sont très voisines entre elles et constituent un ensemble très cohérent :

<i>B₁</i>	Pyorrhée, par passage sur cobaye.
<i>B₃</i>	Stomatite, par passage sur cobaye.
<i>B₄</i>	Stomatite, par passage sur cobaye.
<i>B₅</i>	Gangrène pulmonaire.
<i>B₆</i>	Gangrène pulmonaire.
<i>B₈</i>	Pyorrhée.

Deux autres souches sont rattachées par nous à cette espèce, bien que présentant des caractères un peu aberrants :

H ₁	Angine de Vincent.
H ₂	Angine de Vincent.

Il n'est pas douteux que ce spirochète soit au moins aussi commun que *Sp. microdentium*, mais l'examen microscopique des frottis de sécrétions ne permet pas son identification immédiate.

MORPHOLOGIE.

1^o Morphologie des cultures jeunes.

En cultures de trois à cinq jours, en bouillon-sérum-rein, provenant du repiquage d'une culture jeune, la morphologie de nos souches de *Sp. ambigua* présente des caractères d'une grande fixité.

A. *Examen au fond noir*. — Au fond noir, les microorganismes se présentent avec des dimensions très voisines de celles de *Sp. microdentium*. La longueur moyenne, l'écartement des tours de spire sont les mêmes. L'épaisseur paraît parfois un peu plus forte, au moins pour certaines souches. *Sp. ambigua* est activement mobile. Il présente un mouvement principal de rotation autour de son grand axe (mouvement hélicoïdal) qui s'associe à des mouvements rapides de flexion latérale et qui le font paraître, au moins par instants, animé d'un véritable tremblement vibratoire. Il a ainsi une apparence moins rigide que *Sp. microdentium* et peut, à ce stade, être distingué de ce germe par un œil expérimenté. Beaucoup d'éléments sont en voie de multiplication homotypique (2) simple ou multiple ; on observe fréquemment des amas en étoile. Les tours de spire rigides sont étroits, légèrement anguleux, mais moins que ceux de *Sp. microdentium*.

B. *Examen des frottis colorés*. — *Sp. ambigua* se colore par le Giemsa et par les diverses techniques de coloration des cils. Par notre technique de Fontana-Tribondeau modifiée (3), les frottis de cultures jeunes imprégnés ne diffèrent en aucune

(2) SÉGUIN (P.), 1939-1940. *Loc. cit.*

(3) *Ibid.*

manière de ceux de *Sp. microdentium* et ne peuvent en être distingués à l'examen microscopique.

2° Morphologie des cultures âgées.

Toutes les formes involutives que nous avons décrites chez *Sp. microdentium* se retrouvent chez *Sp. ambigua*. Notons

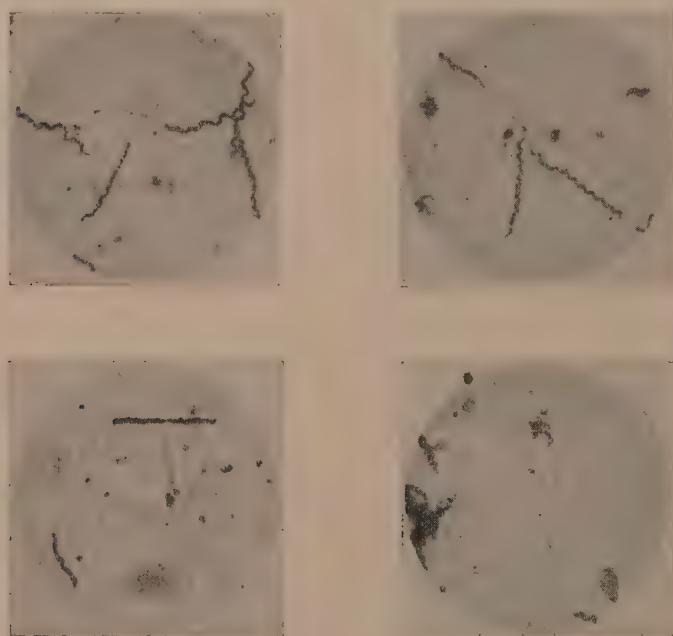


FIG. 1. — Granules spirochétogènes de *Sp. microdentium* *Sp. ambigua*. En bas, à gauche, *Sp. ambigua* (souche B₁) au-dessous d'une division homotypique, on voit 3 granules spirochétogènes libres. Les 3 autres microphotographies se rapportent à *Sp. microdentium* (souche Mad.), on y remarquera des granules spirochétogènes encore reliés au spirochète par le filament périplas-mique et des granules libres. Ces préparations ont été colorées par B. Weis-brem. Imprégnations à l'argent. Camera Leitz Makam, obj. Koritzka semi ap. 1/15. Oc. Leitz périplanitaire 15 X. (P. Séguin, phot.).

seulement que dans les vieilles cultures les formes très longues, filamenteuses sont plus rares chez ce dernier.

De même que chez *Sp. microdentium*, les divisions transversales inégales (division hétérotypique) sont fréquentes dans les cultures âgées. Ces processus aboutissent à la forma-

tion de granules spirochétogènes que l'on peut mettre en évidence sur des frottis de cultures de quatre à cinq semaines en bouillon-ascite-rein. Ces éléments sont extrêmement petits, pourvus d'un filament très fin et régulièrement ondulé. Ils sont difficiles à bien imprégner et très semblables aux mêmes éléments provenant des cultures âgées de *Sp. microdentium* (voir fig. 1).

ISOLEMENT.

Nos souches de *Sp. ambigua* ont été isolées à partir de colonies séparées obtenues en gélose-sérum de mouton (milieu MS), additionnée de rein frais. On peut également obtenir ce germe à partir du sérum hémicoagulé-rein, additionné ou non de vert de malachite. Il est curieux de constater que trois de nos souches proviennent de l'ensemencement de pus de lésions expérimentales de cobaye (abcès putrides) produites par l'inoculation de sécrétions de stomatite ou de pyorrhée. Mais, il faut retenir que pour l'isolement de ce spirochète, la présence du rein frais dans les premiers tubes de culture est toujours indispensable. Ce n'est qu'après de nombreux repiquages (plus ou moins nombreux selon la souche) que le microbe peut s'adapter aux milieux au rein autoclavé. A ce point de vue, il est plus délicat que *Sp. microdentium*.

Lorsqu'on sépare ce germe, il faut encore veiller à procéder à des repiquages très rapprochés pour éliminer les éléments de *Sp. microdentium* qui pourraient être mêlés à la culture. Le mélange des deux espèces n'est pas en effet exceptionnel ; il se traduit par des caractères protéolytiques anormaux. De telles souches impures peuvent, un certain temps, en imposer pour des souches nouvelles intermédiaires entre les deux espèces. A deux reprises (souches GP₂K, gangrène pulmonaire et Fer, gingivite chronique) nous avons ainsi été induits en erreur et il nous a fallu plusieurs mois d'étude pour reconnaître le caractère mixte de nos cultures.

CARACTÈRES CULTURAUX.

Sp. ambigua se développe dans tous les milieux à base de sérum (ou succédanés) utilisés pour *Sp. microdentium*. Il s'y

comporte comme un anaérobiose strict, thermophile, avec optimum de température aux environs de 35°.

1° *Milieux au rein frais.*

Ce sont les milieux de choix pour l'isolement et pour la conservation.

A. MILIEUX LIQUIDES. — a) *Bouillon-rein-sérum de cheval.* — La culture fille lorsqu'elle provient du repiquage d'une culture jeune est apparente d'ordinaire en trois jours. Un trouble léger s'élève du fond du tube, surmonté d'anneaux moirés comparables à ceux décrits dans les cultures de *Sp. microdentium*. Le trouble s'étend progressivement de la zone anaérobiose vers la surface. Le sérum n'est ni précipité, ni visiblement digéré. Les cultures ont une odeur fétide.

La réaction du milieu devient acide, le pH passant de 7,8, à l'ensemencement, pour atteindre 7,1 au cinquième jour et 6,3 au neuvième.

b) *Bouillon-rein-sérum de mouton.* — Mêmes caractères de culture.

c) *Bouillon-rein-ascite.* — Le trouble observé dans la zone profonde est minime ; les anneaux moirés sont peu visibles ou absents. Le milieu reste clair ; on n'y observe ni coagulation, ni noircissement.

L'odeur de la culture est fétide.

B. MILIEUX SOLIDES AU REIN FRAIS. — a) *Gélose-sérum-rein de lapin.* — En gélose-sérum (cheval ou mouton)-rein, les colonies apparaissent dès le troisième jour. Ce sont des colonies nébuleuses, à centre moins opaque que celles de *Sp. microdentium*, entourées de halos transparents et flous. Elles se localisent d'abord dans le tiers inférieur du tube, au voisinage du rein et de la strie d'ensemencement ; puis, peu à peu, elles s'étendent en largeur et en hauteur. Au bout d'une dizaine de jours d'étuve, les colonies confluentes forment un halo ininterrompu dans toute la zone anaérobiose du tube de culture. Les cultures âgées ont une odeur fétide marquée.

En gélose-ascite-rein, les colonies sont beaucoup plus trans-

parentes et floues qu'en gélose-sérum. Elles restent localisées au voisinage de la strie d'ensemencement, quel que soit l'âge de la culture.

Faisons encore remarquer que si la gélose préparée avec du bouillon de viande macérée (milieu MS) constitue pour le *Sp. ambigua* un milieu de choix, on peut cependant repiquer avec succès cet organisme dans de la gélose-sérum-rein frais de lapin, préparée avec du bouillon ordinaire, à condition que le pH du milieu reste compris entre 7,5 et 8.

A ce point de vue, le *Sp. ambigua* comme le *Sp. microdentium* peut s'adapter à des conditions de culture assez variées.

b) *Gélatine-sérum-rein de lapin.* — La culture se développe à l'étuve à 35° ; après trois-quatre jours, un trouble apparaît dans le fond du tube, dans le voisinage du rein. Il a peu de tendance à s'accroître et reste localisé dans le tiers inférieur du tube. Le sérum n'est ni précipité, ni visiblement digéré.

Si l'on porte les tubes à la glacière, six jours, quinze jours ou même un mois après l'ensemencement, le milieu redevient solide.

Sp. ambigua ne liquéfie donc pas la gélatine. La culture a cependant une odeur fétide.

c) *Sérum hémicoagulé-rein de lapin.* — Les colonies apparaissent vers le troisième jour, le long de la strie d'ensemencement et dans le tiers inférieur du tube.

En sérum de cheval, les colonies nuageuses et floues s'étendent peu à peu dans tout le milieu qui prend une teinte noirâtre, seulement dans la zone la plus profonde, au voisinage du rein. Après un mois d'étuve, le sérum n'est pas liquéfié.

En sérum de bœuf, les colonies, vers le dixième jour, se pigmentent en noir et forment ainsi des halos noirâtres qui tranchent sur le fond clair du milieu. Les cultures âgées de plus d'un mois ont une teinte gris noirâtre uniforme. Le milieu, fétide, n'est pas liquéfié.

d) *Gélose-sérum-rein, rouge neutre.* — Dès l'apparition des colonies, une faible fluorescence apparaît le long de la strie d'ensemencement. Cette fluorescence s'accentue dans les jours qui suivent, mais elle est moins intense que celle produite dans les mêmes conditions par le *Sp. microdentium*.

e) *Gélose-sérum-rein, vert de malachite.* — Dans ce milieu,

Sp. ambigua réduit rapidement le vert de malachite qui prend une teinte jaune soufre. L'action réductrice est aussi intense que celle opérée par le *Sp. microdentium* dans le même milieu.

f) *Gélose-sérum-rein, sous-acétate de plomb.* — Dès l'apparition des colonies, vers le troisième jour, la strie d'ensemencement prend une teinte brunâtre. Le noircissement progresse légèrement les jours suivants, mais n'est jamais aussi intense ni aussi étendu que celui provoqué par *Sp. microdentium*.

2° Milieu au rein autoclavé.

Sp. ambigua se développe dans tous les milieux à base de sérum (ou succédané) et dans lesquels du rein stérilisé à l'autoclave est substitué au rein frais. Comme pour *Sp. microdentium*, ces milieux ne conviennent pas pour l'isolement et ne doivent être utilisés que pour des souches déjà adaptées.

L'adaptation des souches de *Sp. ambigua* à ces milieux est plus ou moins rapide, suivant les souches. B , B_3 , B_4 , B_6 , B_8 s'y sont rapidement adaptées ; B_5 beaucoup plus lentement. Le développement de H_1 et H_2 en ces milieux est encore inconstant.

Le départ de la culture est habituellement plus long et sa richesse un peu moindre que dans les milieux au rein frais. Pour les souches bien adaptées, les milieux solides au rein autoclavé (gélose-sérum, sérum hémicoagulé) conviennent fort bien pour l'entretien des souches.

3° Milieux au sérum sans rein.

Sp. ambigua comme *Sp. microdentium*, peut s'adapter à des milieux au sérum (ou succédanés), liquides ou solides, dans lesquels l'action réductrice du rein est remplacée par d'autres conditions physiques ou physico-chimiques équivalentes.

A. MILIEUX LIQUIDES SANS REIN. — Nous avons obtenu des cultures de *Sp. ambigua* en bouillon-sérum dans le vide et en bouillon gélosé à 0,1 p. 100 (milieu de Klodnitzky ou milieu K), additionné de sérum.

a) *Bouillon-sérum dans le vide*. — Dans ce milieu, après un vide soigné, les souches les mieux adaptées aux milieux au rein autoclavé se développent assez régulièrement. Le trouble est moins apparent que dans les milieux au sérum additionné de rein. La culture a une odeur fétide. Le sérum n'est ni précipité, ni digéré. Il y a lieu de noter que, conservées à l'étuve, les cultures peuvent dans ces conditions rester très longtemps vivantes. Nous avons eu des repiquages positifs après six mois et même deux ans d'étuve.

b) *Bouillon K-sérum*. — En milieu semi-liquide bouillon-gélosé à 0,1 p. 100, additionné de sérum, *Sp. ambigua* se développe moins richement que dans le bouillon-sérum additionné de rein frais ou autoclavé. Mais les insuccès sont rares. Cependant, dans ce milieu, les spirochètes perdent rapidement leur mobilité. Il est peu recommandé pour la conservation des souches.

B. MILIEUX SOLIDES SANS REIN. — a) *Gélose MS-sérum*. — En gélose préparée avec du bouillon de viande macérée, additionnée de sérum (formule MS) le *Sp. ambigua* se développe comme dans les tubes de gélose-sérum au rein autoclavé. Les cultures adaptées à ce dernier milieu peuvent être repiquées en gélose-sérum sans rein. Les insuccès sont rares.

b) *Sérum hémicoagulé sans rein*. — En milieu de Schereschevsky sans rein, on peut également obtenir des cultures positives, avec les souches adaptées. Les cultures sont un peu moins riches que dans les milieux additionnés de rein. Ces derniers sont toujours préférables lorsqu'il s'agit de la conservation des souches.

VITALITÉ DES CULTURES.

La vitalité des cultures de *Sp. ambigua* paraît comparable à celle de *Sp. microdentium*. Elle dépend des mêmes causes (nature du milieu, âge de la culture, température).

Il faut cependant remarquer que *Sp. ambigua* qui ne liquéfie pas le sérum hémicoagulé s'y conserve plus longtemps à 35° que le *microdentium*. Des cultures positives ont été obtenues

en repiquant des souches en milieu S conservées à l'étuve six mois, dix mois et même deux ans. De même, une culture en bouillon-sérum dans le vide, conservée deux ans à l'étuve, a donné encore un repiquage positif.

Il serait cependant peu prudent de se fier à ces réussites de caractère un peu exceptionnel. En pratique, le milieu le plus sûr de conservation est la gélose MS-rein. Les repiquages y sont effectués tous les mois.

CYCLE ÉVOLUTIF.

Le cycle évolutif de *Sp. ambigua* paraît calqué sur celui de *Sp. microdentium*.

Dans les cultures jeunes la multiplication s'effectue par des divisions transversales simples ou multiples qui se succèdent à un rythme rapide et aboutissent à la formation de spirochètes égaux. C'est ce que l'un de nous a appelé la segmentation homotypique. Ce processus de division suffit à lui seul à entretenir l'exubérance indéfinie de la culture, si l'on procède à des repiquages suffisamment rapprochés dans des milieux favorables.

Si on laisse vieillir la culture à l'étuve (culture de trois-six semaines), on constate que les spirochètes se fragmentent en segments inégaux. C'est la division transversale hétérotypique qui aboutit à la libération de microspirochètes de taille variable, 1, 2, 3 tours de spires et de granules encore plus petits munis d'un filament ondulé, les granules spirochétogènes. Ceux-ci, parfois très abondants dans les cultures vieillies (par exemple en bouillon-rein-liquide d'ascite [voir fig. 1]) évoluent sans doute suivant le processus entrevu chez *Sp. microdentium* et bien étudié chez *Sp. calligyra* (4).

Bien que, dans le cas particulier de *Sp. ambigua*, l'évolution des granules n'ait pu être entièrement suivie, il semble qu'ils évoluent en donnant des formes filamenteuses peu réfringentes et peu mobiles. Ces dernières par division hétérotypique donnent naissance à des microspirochètes vivaces et

(4) SÉGUIN (P.), 1939-1940. *Loc. cit.*

très mobiles, aptes après croissance à se diviser suivant le mode homotypique, et à rétablir ainsi la prospérité de la culture.

L'alternance des divisions homotypiques et hétérotypiques déterminée par des conditions de nutrition apparaît, pour *Sp. ambigua* comme pour *Sp. microdentium*, le seul cycle évolutif démontrable « *in vitro* ». Au cours de cette évolution, les granules spirochétogènes, formes de résistance apparues dans les cultures vieillies, jouent certainement un rôle de premier plan.

PROPRIÉTÉS BIOCHIMIQUES.

Ce qui frappe dans l'étude des caractères culturaux du *Sp. ambigua*, c'est le contraste qu'ils offrent avec ceux attribués à *Sp. microdentium*.

Alors que ce dernier liquéfie la gélatine, digère le sérum, coagule l'ovalbumine en poussant très loin la dégradation des substances albuminoïdes, *Sp. ambigua* n'attaque pas la gélatine et ne digère pas le sérum. Cependant les cultures sont fétides, le microbe produit H_2S bien qu'en quantité moindre que *Sp. microdentium*.

Comme pour ce dernier organisme, les premières cultures sont favorisées par un microbe protéolytique (*B. fusiforme*) ou par l'autolyse d'un tissu frais.

Sp. ambigua peut du reste s'affranchir de ces conditions quoique plus difficilement que *Sp. microdentium*, puisqu'il est possible, après un nombre variable de repiquages, suivant les souches, d'en obtenir des cultures dans des milieux au rein autoclavé ou dans des milieux sans rein.

En ce qui concerne les hydrates de carbone, les souches étudiées suivant la technique donnée pour *Sp. microdentium* n'ont pas attaqué : glucose, lévulose, galactose, saccharose, maltose, lactose, dulcite, mannite et inuline (5).

L'action fermentative sur les sucres est donc nulle.

(5) Par suite d'une erreur typographique, l'eau peptonée gélose-sérum utilisée pour ces réactions est indiquée dans notre premier mémoire comme contenant 1 p. 100 de gélose. Il faut lire 1 p. 1.000 (*loc. cit.*, p. 289).

OXYDO-RÉDUCTION.

L'étude du graphique figuré ici (voir fig. 2) nous montre que *Sp. ambigua* cultivé en milieu MS abaisse le potentiel aux environs de —280 millivolts vers le septième jour de la culture (électrode basse). Rappelons qu'un même abaissement se produisait déjà avec *Sp. microdentium* au troisième jour

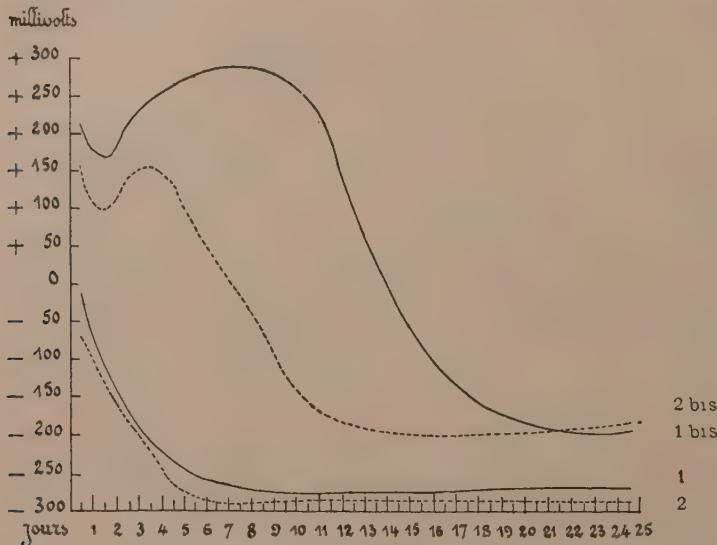


FIG. 2. — *Sp. ambigua*. Mesures potentiométriques. 1 et 2, tracés de l'électrode basse; 1 bis et 2 bis, tracés de l'électrode haute. Souches B_1 (----) et B_2 (—).

de la culture. L'abaissement du potentiel électrique du milieu est donc moins rapide dans les cultures de *Sp. ambigua* que dans celles de *Sp. microdentium*.

Toutes les mesures électrométriques ont été faites avec la collaboration de notre ami, M. Daufresne, que nous sommes heureux de remercier ici pour l'aide précieuse qu'il nous a apportée. M. Daufresne se propose d'ailleurs de publier dans une thèse un travail détaillé sur cette question.

POUVOIR PATHOGÈNE.

Le pouvoir pathogène de *Sp. ambigua* paraît être équivalent de celui de *Sp. microdentium* ; nul ou très faible lorsqu'on inocule, sous la peau du cobaye à la dose de 2 à 4 cent. cubes de culture pure, il ne se manifeste que dans certaines conditions d'association.

Voici, à titre d'exemple, le protocole d'une expérience réalisée avec la souche B₆ :

Le 4 novembre 1935, le cobaye B₈₃ reçoit sous la peau 4 cent. cubes de culture en bouillon-sérum-rein, mélange de *Sp. ambigua* (souche B₆) et de *B. fusiforme* de Vincent (souche Ma).

Le lendemain, on note un œdème étendu à la fosse iliaque gauche.

Le surlendemain, l'œdème tend à se limiter, un noyau d'induration profonde persiste.

Le 10 novembre, un abcès sous-cutané gros comme une noisette est formé. Il contient un pus épais, fétide, ce pus renferme d'assez nombreux spirochètes libres et des bacilles fusiformes.

C'est là, point par point, la répétition des expériences entreprises avec *Sp. microdentium*.

AGGLUTININES.

Nous avons préparé, suivant la technique déjà donnée, un sérum agglutinant avec la souche B₄. Le sérum, en employant des émulsions de microbes centrifugés et lavés dans l'eau physiologique (6), agglutinait la souche homologue à plus de 1/500. Il nous a permis de rattacher avec certitude à l'espèce *Sp. ambigua* les souches B₃, B₁ et B₅ ; B₆ et B₈ agglutinaient plus faiblement. Par contre, les souches aberrantes H₁ et H₂ n'ont pas agglutiné.

Ces résultats sont résumés dans le tableau de la page suivante :

Nous considérons, au moins provisoirement, les souches aberrantes H₁ et H₂ comme des races sérologiques indépendantes de *Sp. ambigua*.

Ajoutons que le sérum B₄ n'a agglutiné aucun autre spirochète buccal (*Sp. microdentium*, *Sp. comandoni*, *Sp. microdentium*, etc...).

(6) SÉGUIN (P.) et VINZENT (R.), 1938 (*loc. cit.*, p. 293).

SOUCHES	TITRE DES DILUTIONS				
	1/50	1/100	1/200	1/500	1/1.000
B ₄	+++	+++	+++	+++	+
B ₃	+++	+++	+++	+	
B ₁	+++	+++	+++	++	
B ₅	+++	+++	++		
B ₆	++	+	—	—	—
B ₈	++	++	+		
H ₁	—	—	—	—	—
H ₂	—	—	—	—	—

Réciproquement, les sérums correspondant à ces diverses espèces ont donné des réactions négatives en présence des émulsions de toutes nos souches de *Sp. ambigua*.

POSITION DANS LA SYSTÉMATIQUE.

Par sa morphologie, *Sp. ambigua* est très voisin de *Sp. microdentium*; il ne peut en être distingué que par les caractères de sa mobilité étudiée dans les cultures jeunes. Encore faut-il un œil exercé.

Par contre, les caractères culturaux et biologiques sont très différents. Contrairement à *Sp. microdentium*, *Sp. ambigua* ne liquifie ni la gélatine, ni le sérum coagulé. Il ne précipite ni ne digère le sérum des milieux liquides. Les colonies en gélose-sérum-rein sont plus transparentes.

Les cultures sont fétides mais le noircissement des milieux au plomb est moindre.

Les caractères de réduction dans les milieux colorés spéciaux (au rouge neutre, au vert de malachite, etc...) sont les mêmes, mais généralement moins marqués et plus longs à apparaître. Retenons que *Sp. ambigua* (comme *Sp. microdentium*, mais un peu plus difficilement que lui) s'adapte aux milieux au rein autoclavé et même aux milieux sans rein.

Aucune souche de *Sp. ambigua* n'agglutine en présence du sérum *antimicrodentium* et réciproquement.

II. — *Sp. comandoni* (nov. sp.).

Nous avons dédié cette nouvelle espèce à notre ami le Dr Comandon qui, dans un excellent travail sur la morphologie des spirochètes buccaux, a décrit, le premier, la mobilité caractéristique de ce microorganisme. Nous avons étudié six souches qui, à quelques différences morphologiques près, forment, par leurs caractères culturaux et biologiques communs, un ensemble suffisamment cohérent.

HABITAT.

Sp. comandoni a été isolé de diverses lésions de la bouche et des voies respiratoires. Sa morphologie spéciale permet d'y affirmer sa fréquence. Voici la liste et l'origine des souches qui servent de base à notre description.

Plan...	Pyorrhée.
Momi....	Ganglion pulmonaire.
Pint....	Pyorrhée.
Vib....	Pyorrhée.
Boisv...	Accident de dent de sagesse.
Penav...	Accident de dent de sagesse.

MORPHOLOGIE.

Sp. comandoni se présente sous des aspects très différents en culture jeune et en culture âgée.

1° MORPHOLOGIE EN CULTURE JEUNE. — En bouillon-sérum-rein (trois-cinq jours). *Sp. comandoni* est nettement plus long et plus large que *Sp. microdentium* et *Sp. ambigua*.

A. *Examen au fond noir*. — Au fond noir, les microorganismes, de longueur sensiblement égale (longueur : 6-12 μ , largeur : 0 μ 5), sont animés d'un mouvement particulier. Ce mouvement, manifeste chez les souches que nous considérons comme les plus typiques (Plan..., Pint...), est moins apparent chez des souches à ce point de vue un peu aberrantes (Vib..., Penav...). Notons, à ce propos, que pour se rendre compte

de la mobilité réelle des spirochètes, l'examen des cultures vivantes entre lame et lamelle ne donne pas toujours des renseignements exacts. Ces organismes ne manifestent pleinement leur mobilité, comme du reste beaucoup d'anaérobies, que lorsqu'on les soustrait à l'action de l'oxygène de l'air. En prenant soin d'examiner les cultures vivantes dans des tubes capillaires aplatis, fermés aux deux extrémités, il est toujours possible d'observer les spirochètes au fond noir avec leurs mouvements actifs caractéristiques. Ceci posé, retenons



FIG. 3. — *Sp. comandoni*. Souche Plan. Culture de 5 jours en bouillon-sérum-rein frais de lapin. Remarquer les 2 aspects caractéristiques du spirochète, éléments à spires serrées et éléments à spires relâchées et irrégulières. Ce dimorphisme est en relation avec les caractères de mobilité particuliers à ce germe. Imprégnation à l'argent. Caméra Leitz Makam. Obj. Koritzka semi ap. 1/15. Oc. Leitz périplanétique 45 X. (P. Séguin, phot.).

que *Sp. comandoni* paraît animé d'un double mouvement hélicoïdal. Tantôt il semble posséder des tours de spire larges et arrondis (d'au moins 2 μ), puis brusquement ceux-ci se décomposent en tours de spire plus étroits et faiblement anguleux. En plus d'un double mouvement hélicoïdal, ce spirochète présente un léger mouvement d'ondulation latérale qui n'est pas sans rappeler celui de *Sp. pallida*.

Les souches atypiques (Vib., Penav.) ne présentent que rare-

ment ce double mouvement hélicoïdal. Les tours de spire sont plus réguliers et plus aplatis. Les organismes plus longs sont souvent disposés en écheveaux.

B. *Examen des frottis colorés.* — Sur les imprégnations de cultures jeunes, *Sp. comandoni* offre un aspect sinuex et irrégulier, correspondant à la complexité de ses mouvements (fig. 3). Les organismes sont fréquemment en voie de division transversale homotypique. Les filaments terminaux ondulés sont rares et semblent principalement l'apanage des formes un peu irrégulières, plus épaisses, déjà évoluées. Les divisions transversales multiples sont moins communes que dans les cultures jeunes de *microdentium* et *d'ambigua*. Les amas en étoile ne sont pas rares.

2^o MORPHOLOGIE EN CULTURE AGÉE. — En bouillon-sérum-rein de trois-six semaines, l'aspect des cultures âgées diffère profondément de celui des cultures jeunes.

A. *Examen au fond noir.* — Au fond noir, la mobilité est très faible. Quelques spirochètes présentent encore des mouvements intermittents et saccadés. Les formes d'involution habituelles, formes épaissies ou variqueuses, boucles ou anneaux, sont nombreuses ; par contre, les filaments détendus, allongés, plus ou moins granuleux, sont rares. On remarque surtout des éléments courts, fragmentaires, de taille inégale.

B. *Examen des frottis colorés.* — Sur les imprégnations, dominent des éléments de petite taille à 3-4 tours de spire, souvent en voie de division transversale hétérotypique ; on arrive ainsi à tous les stades de la libération de microspirochètes de 1 ou 2 tours. Ces formes présentent souvent à l'une de leurs extrémités, parfois aux deux, un filament terminal ondulé. On remarque encore des formes épaissies et variqueuses, des éléments en tête et d'assez nombreux spirochètes enroulés (boucles et anneaux) à des stades divers de concentration (fig. 4).

Enfin, dans ces cultures âgées (et surtout en bouillon-ascite-rein), les granules spirochétogènes sont fréquents. Ils se présentent sous forme de granulations argentophiles prolongées par un filament ondulé grisâtre. Il est à remarquer que les ondulations du filament sont plus larges et plus aplatis que

celles de *Sp. microdentium* ou de *Sp. ambigua*. Parfois un filament existe de chaque côté du granule (voir fig. 4).

Ces éléments, un peu plus gros et plus faciles à mettre en évidence que chez les espèces précédemment étudiées, nais-

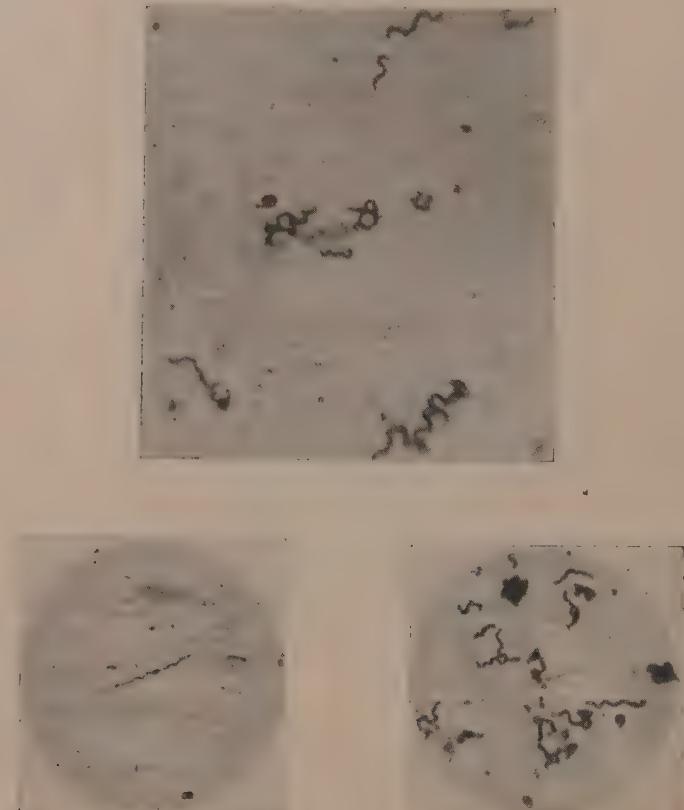


FIG. 4. — *Sp. comandoni*. Cultures de trois semaines en bouillon ascite rein de lapin. En haut (souche Pint.). Remarquer les éléments courts et fragmentés, ainsi que les formes en voie d'enroulement (boucles et anneaux plus ou moins concentrés). A gauche (souche Plan) un granule spirochétogène libre présentant un filament ondulé à chaque extrémité. Les tours de spire du filament sont lâches et plats. A droite (souche Plan). En haut, un granule libre, entouré de spirochetes fragmentés et en voie d'enroulement. Imprégnation à l'argent. Caméra Leitz Makam. Obj. Koritzka semi ap. 1/15. Oc. Leitz périplanétique 15 —. (P. Séguin, phot.).

sent par division hétérotypique simple ou multiple ; ils ne peuvent être interprétés que comme des formes de multipli-

cation apparues dans des conditions de souffrance dans des cultures vieillies.

ISOLEMENT.

La séparation de *Sp. comandoni* peut être obtenue aussi bien en ensemencant les sécrétions dans de la gélose-sérum (M S) que dans des tubes de sérum hémicoagulé (S et S₂). Mais dans l'un ou l'autre cas, l'addition du rein frais est indispensable.

L'isolement n'offre aucune difficulté particulière digne d'être notée ; la morphologie caractéristique du germe facilite du reste la tâche du technicien.

Sp. comandoni est souvent accompagné dans les premières cultures de *Sp. macrodentium*. Celui-ci étant plus délicat, tend à disparaître au cours des repiquages et est ainsi facilement éliminé. Parmi les fusiformes, le bacille de Shmamine paraît être l'associé le plus habituel de *Sp. comandoni* ; il favorise à un haut degré la culture de ce spirochète. Dans les milieux habituels, ce fusiforme est du reste moins résistant que l'organisme hélicoïdal. En abandonnant des tubes contenant une culture mixte (*Sp. comandoni* + B. de Shmamine) à l'étuve à 35°, au bout d'un mois à un mois et demi, le repiquage donne le spirochète en culture pure.

La pureté des souches est contrôlée en gélose MS-sérum-rein frais, par la technique de Veillon ; en partant d'une colonie bien séparée, on parfait l'isolement.

CARACTÈRES CULTURAUX.

Les cultures pures de *Sp. comandoni* sont repiquées dans les milieux suivants :

- 1^o Milieux au rein frais ;
- 2^o Milieux au rein autoclavé ;
- 3^o Milieux sans rein.

Indiquons tout de suite que, dans ces conditions diverses, les caractères culturaux de *Sp. comandoni* sont à peu de chose près identiques à ceux de *Sp. ambigua*. Pour éviter des redites, nous passerons rapidement en revue les milieux utilisés, en entre les deux espèces.

insistant seulement sur les différences que l'on peut relever

1^o *Milieux au rein frais.*

Ce sont les milieux de choix pour l'étude du germe.

A. MILIEUX LIQUIDES AU REIN FRAIS. — Le bouillon au rein frais additionné de sérum (ou succédané) convient bien pour la culture de *Sp. comandoni* (pH 7,6 à 8).

a) *Bouillon-rein-sérum.* — En bouillon-rein-sérum (cheval, mouton, bœuf, etc...) les caractères sont semblables à ceux décrits chez *Sp. ambigua* : même délai de culture, même trouble léger surmonté d'ondes moirées caractéristiques, même réaction acide du milieu ; le sérum n'est ni précipité, ni digéré.

L'odeur des cultures est cependant moins fétide. C'est une odeur faiblement sulfhydryque que l'on ne peut mieux comparer qu'à celle des œufs durcis.

b) *Bouillon-rein-liquide d'ascite.* — Mêmes caractères que chez *Sp. ambigua*.

B. MILIEUX SOLIDES AU REIN FRAIS. — a) *Gélose-sérum-rein de lapin.* — Comme chez *Sp. ambigua* les colonies sont floues, plus claires que celles de *microdentium*, localisées à l'origine au voisinage du rein et de la strie d'ensemencement. Là encore, la gélose MS n'est pas indispensable pour obtenir des repiquages positifs.

Remarquons cependant l'odeur moins accusée des cultures. Les cultures vieillies noircissent moins que celle d'*ambigua*. Le caractère est particulièrement apparent en gélose-rein-sérum de bœuf.

b) *Gélatine-sérum au rein frais.* — Dans ce milieu, les cultures âgées, sorties de l'étuve à 35° et portées à la glacière font toujours prise. *Sp. comandoni*, comme *Sp. ambigua* ne liquéfie donc pas la gélatine.

c) *Sérum hémicoagulé au rein frais.* — Pas plus que *Sp. ambigua*, *Sp. comandoni* ne liquéfie le sérum coagulé. Les vieilles cultures de celui-ci sont moins pigmentées de noir. Elles sont moins fétides et présentent nettement l'odeur caractéristique d'œuf dur.

- d) *Gélose-sérum-rein, rouge neutre.*
- e) *Gélose-sérum-rein, vert de malachite.* — Dans ces deux milieux, les réactions réductrices sont positives ; mais elles apparaissent plus tardivement et sont moins intenses chez *Sp. comandoni* que chez *Sp. ambigua*.
- f) *Gélose-sérum-rein, sous-acétate de plomb.* — La strie d'ensemencement noircit plus tardivement que chez *Sp. ambigua*. Le milieu, dans la zone d'anaérobiose, prend en vieillissant une teinte brunâtre, moins foncée que celle observée dans les cultures de *Sp. ambigua* de même âge.

2° Milieux au rein autoclavé.

Les différentes souches de *Sp. comandoni* peuvent s'adapter plus ou moins rapidement aux milieux au rein autoclavé. Les caractères sont les mêmes que dans les milieux au rein frais. Mais, comme d'une façon générale, les cultures sont un peu moins riches, les différentes réactions sont un peu moins accusées.

Ces milieux peuvent être utilisés pour la conservation des spirochètes appartenant aux souches bien adaptées.

3° Milieux sans rein.

Comme chez *Sp. ambigua*, les souches de *Sp. comandoni* qui se sont développées dans les milieux au rein autoclavé, peuvent s'adapter aux milieux sans rein, pourvu que les conditions d'anaérobiose se trouvent réalisées.

On peut aussi cultiver ce germe en bouillon-sérum dans le vide, en bouillon-sérum, gélosé à 1 p. 1.000, en gélose-sérum et en sérum hémicoagulé sans rein.

Les remarques faites à propos de *Sp. ambigua* s'appliquent là encore entièrement à *Sp. comandoni*.

VITALITÉ DES CULTURES.

Nous ne pouvons que répéter ici les observations faites pour les espèces précédentes. Des cultures de *Sp. comandoni* (souche Vi), gardées deux ans à l'étuve, en milieu S et en

bouillon-sérum dans le vide, ont pu être repiquées avec succès. Cependant, pour ne courir aucun risque de perdre nos souches, nous les repiquons chaque mois en gélose MS rein frais, milieu d'élection.

CYCLE ÉVOLUTIF.

Là encore on peut opposer le comportement des cultures jeunes et des cultures vieillies.

Suivant la règle, les cultures jeunes se multiplient par division transversale homotypique simple ou multiple ; dans les cultures vieillies les images de division hétérotypique dominent.

Chez *Sp. comandoni*, dont les dimensions sont plus grandes que celles de *Sp. microdentium* et *d'ambigua*, on peut aisément vérifier une particularité de la division transversale, phénomène du reste très général décrit chez *Sp. callipyra* (7).

Au cours des divisions transversales homotypiques, surveillant dans les cultures jeunes, les spirochètes très mobiles, se séparent en tronçons égaux aux points où le périplasme aminci forme charnière. Les mouvements brusques du spirochète amènent une rupture brutale du périplasme ; celui-ci n'est pas étiré, aussi observe-t-on rarement dans les cultures jeunes, en pleine division, des spirochètes prolongés par un filament terminal ondulé.

Au contraire, dans les cultures âgées où la mobilité est beaucoup plus ralentie, les divisions transversales homotypiques ou hétérotypiques s'accompagnent de l'étirement du périplasme qui unit les segments de spirochète en voie de division. Ceci explique que, dans les cultures vieillies, on rencontre tant de spirochètes inégaux possédant tantôt à une extrémité, tantôt aux deux, un filament terminal ondulé ; des microspirochètes à 2 ou 1 tour de spire et des granules spirochétogènes pourvus du même filament sont aussi fréquemment observés.

En ce qui concerne le repiquage des cultures jeunes et des cultures vieillies, tout se passe comme chez *Sp. ambigua*.

(7) SÉGUIN (P.), 1940. *Loc. cit.*

L'alternance des divisions homotypiques et hétérotypiques, réglée par les conditions variables du milieu, paraît être, là aussi, l'essentiel du cycle. Le rôle et l'évolution des spirochétogènes semblent être identiques à ce qui a été indiqué chez les espèces précédentes.

PROPRIÉTÉS BIOCHIMIQUES.

Les caractères culturaux de *Sp. comandoni* sont, comme nous l'avons vu, très voisins de ceux de *Sp. ambigua*. Il n'est pas surprenant, dans ces conditions, que les propriétés biochimiques des deux espèces soient presque identiques. On ne peut retenir comme différence qu'une action moins marquée de *Sp. comandoni* sur les substances protéiques. La preuve en est que certains caractères (fétidité du milieu, noircissement des sels de plomb, action réductrice sur les colorants, pouvoir d'adaptation aux milieux sans rein) sont moins marqués chez cette espèce que chez *Sp. ambigua*. A ce point de vue, elle diffère donc encore plus profondément de *Sp. microdentium*.

En ce qui concerne l'action sur les sucres, *Sp. comandoni*, comme les espèces précédemment étudiées, ne fait fermenter aucun des sucres courants : glucose, lévulose, galactose, saccharose, maltose, lactose, dulcite, mannite et inuline.

OXYDO-RÉDUCTION.

L'examen du graphique (voir fig. 5) montre un abaissement du potentiel assez semblable à celui constaté chez *Sp. ambigua* (—250 à —280 millivolts vers le septième jour, électrode basse), mais entre le douzième et le quinzième jour, les tracés et les électrodes haute et basse tendent à se rejoindre. Ce phénomène n'a été observé chez aucune autre espèce des petits spirochètes buccaux.

POUVOIR PATHOGÈNE.

Aucune souche de *Sp. comandoni* n'a été virulente pour le cobaye (inoculation sous-cutanée, 2-4 cent. cubes).

Nous avons cependant réussi en injectant sous la peau du

cobaye un mélange de culture de *Sp. comandoni* et de *B. fusiforme* (*B. de Vincent, Ma*), à reproduire les mêmes lésions que celles produites dans les mêmes conditions par les spirochètes déjà décrits. Le protocole de l'expérience a été indiqué pour *Sp. ambigua* ; nous n'y revenons pas ici. Indiquons que cette expérience a été reproduite avec le même succès en substituant au *B. de Vincent* un autre fusiforme, le *B. de Shmamine* ; nous avons dit que cet organisme paraît être l'associé

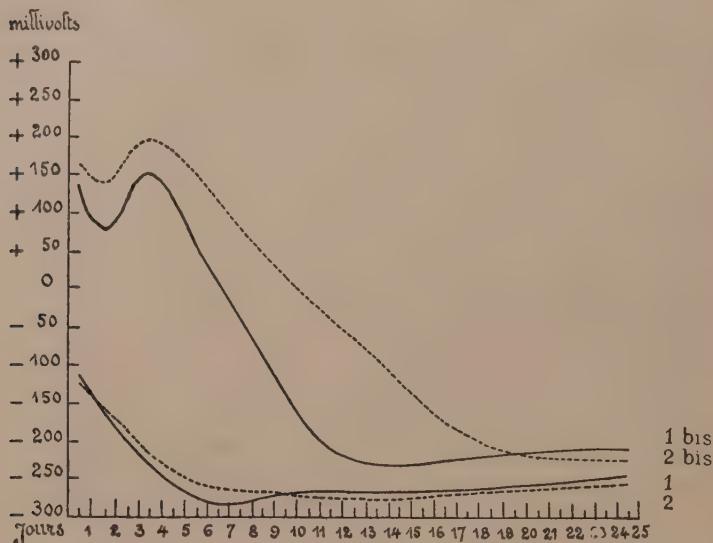


FIG. 5. — *Sp. comandoni*. Mesures potentiométriques; 1 et 2, tracé de l'électrode basse; 1 bis et 2 bis, tracés de l'électrode haute. Souche Pint — et Plan —.

qui, « *in vitro* », favorise le mieux le développement de *Sp. comandoni*.

Quoiqu'il en soit, nous voyons que les caractères tirés du pouvoir pathogène ne peuvent être retenus pour établir des différences entre les espèces étudiées.

AGGLUTININES.

Il n'en est pas de même des réactions d'agglutination qui rendent, comme nous l'avons déjà établi, les plus grands services dans la systématique des spirochètes.

Nous avons préparé, suivant la technique habituelle, un sérum agglutinant avec la souche Plan... Ce sérum a agglutiné à 1/200 la souche homologue. En ce qui concerne les souches hétérologues, trois ont été agglutinées ; pour deux, la réaction a été négative. Il s'agit là encore de souches dont la morphologie était un peu aberrante.

Les résultats de nos expériences sont résumés dans le tableau suivant :

SOUCHES	TITRE DES DILUTIONS DE SÉRUM (Plan...)			
	1/50	1/100	1/200	1/500
Plan...	+++	+++	++	--
Pin...	+++	++	++	--
Boisv...	++	+	--	--
Momi...	++	+	--	--
Vib...	--	--	--	--
Pén...	--	--	--	--

Ajoutons que ce sérum n'a agglutiné aucune souche de *Sp. microdentium* ni de *Sp. ambigua*. Et qu'inversement les réactions d'agglutination croisée pratiquées avec les sérum préparés contre ces deux espèces ont toujours, en présence de *Sp. comandoni*, donné des résultats négatifs.

POSITION DANS LA SYSTÉMATIQUE.

Différant profondément de *Sp. microdentium* et de *Sp. ambigua* par sa morphologie (taille plus grande, mobilité caractéristique), *Sp. comandoni* constitue certainement une espèce distincte.

Ses caractères culturaux et biochimiques l'éloignent de *Sp. microdentium*. Entre ces deux espèces, *Sp. ambigua* semble occuper une position intermédiaire. Il y a cependant, à ce point de vue, des différences bien moins accusées entre *Sp. comandoni* et *Sp. ambigua* qu'entre *Sp. ambigua* et *Sp. microdentium*.

Retenons enfin que les agglutinines établissent assez bien l'autonomie du groupe. Mais là encore des types aberrants constituent des races sérologiques indépendantes.

III. — *Sp. skoliodonta*, Hoffmann, 1920.

Dans une étude sur la morphologie des spirochètes buccaux, Hoffmann (1920) a distingué du *Sp. microdentium* dans le groupe des petits spirochètes de la bouche, deux formes nouvelles pour lesquelles il a créé les noms de *Sp. skoliodonta* et de *Sp. trimerodonta*. R. Vinzent et Daufresne ont pu obtenir ces organismes en culture pure et confirmer ainsi l'existence spécifique des formes nouvelles nommées par Hoffmann. Après examen de ces cultures, l'un de nous identifia à *Sp. skoliodonta* une souche étudiée par lui avec B. Kritchevsky en 1920, cultivée en association avec le *B. fusiforme* et décrite sous le nom de *Sp. acuta*. Comme le nom proposé par Hoffmann est antérieur de quelques mois au nom créé par K. et S., nous avons jugé préférable, en tout état de cause et pour éviter une controverse oiseuse de systématique, d'adopter le nom de l'auteur allemand. *Sp. acuta* tombe ainsi en synonymie.

HABITAT.

Fréquent dans la flore de la bouche, où sa morphologie particulière permet à un œil exercé de le reconnaître aisément, *Sp. skoliodonta* se rencontre aussi dans les sécrétions provenant des infections fétides et gangrénées des voies respiratoires. Nous rattachons encore à cette espèce une souche isolée par l'un de nous dans le pus d'un ulcère tropical. La lésion fut étudiée chez un Sénégalais en traitement à l'hôpital du Havre.

L'identification d'un spirochète provenant d'une lésion cutanée à une espèce buccale nous paraît intéressante. Elle apporte une première preuve de l'identité possible des spirochètes des ulcères cutanés avec ceux de la bouche. Des recherches ultérieures montreront, sans doute, si cette identification peut être étendue.

Nous donnons ci-dessous la liste des souches rapportées à

Sp. skoliodonta et sur lesquelles repose notre description. Elle comprend des formes typiques et quelques formes aberrantes.

1. *Sp. acuta* (pyorrhée par cobaye).
2. *C₄* pyorrhée.
3. *C₉* Stomatite.
7. Adénite malaire.
8. Stomatite.
9. Dalsace (fistule du sinus maxillaire).
10. *C₅* gangrène pulmonaire.
11. A. de V. (angine de Vincent).
12. Sén. (ulcère cutané).

MORPHOLOGIE.

La morphologie de *Sp. skoliodonta* est suffisamment caractérisée pour qu'Hoffmann, sur le seul aspect des spirochètes dans les lésions, ait pu distinguer cette espèce buccale. Il faut cependant faire observer qu'à côté des souches typiques (acuta, C 1, C 2, C 3) qui présentent du reste entre elles des différences de détail, il existe des souches aberrantes (A. de V. par exemple) que l'ensemble de leurs autres caractères permet cependant de rattacher à ce groupe.

1^o Morphologie en culture jeune.

C'est en bouillon-sérum-rein, culture de trois-cinq jours, que l'organisme a son aspect le plus caractéristique.

A. EXAMEN AU FOND NOIR. — Au fond noir, *Sp. skoliodonta* est moins réfringent que les autres espèces déjà décrites, il apparaît moins brillant, plus difficile à étudier. Dimensions moyennes (longueur : 8 μ ; largeur : 0 μ 3). Dans les conditions d'anaérobiose, par exemple en tube capillaire fermé aux deux bouts, il est très activement mobile. Il est très souple et tourne avec une telle rapidité qu'il apparaît comme rectiligne.

Entre lame et lamelle, on observe également des formes présentant cette mobilité, mais, le plus souvent, l'organisme est animé de mouvements beaucoup plus lents, vermiculaires. A l'état de repos, il présente, en plus de ses spires, des ondulations au nombre de 3 à 4, qui donnent au spirochète son aspect bossué (voir fig. 6), d'où Hoffmann a tiré le nom de l'espèce.

Les formes atypiques sont généralement plus longues, les éléments de la souche A. de V., par exemple, en pleine mobi-



FIG. 6. — *Sp. skolioidonta*. Microphotographie de culture vivante (D^r Comandon).

lité, sont animés d'un mouvement très rapide qui les fait paraître rectilignes.



FIG. 7. — *Sp. skolioidonta* (souche C₁). Culture de 18 jours en bouillon K sérum rein frais de lapin. On remarque les tours de spire plats et bossués de l'organisme. Imprégnation à l'argent. Caméra Leitz Makam. Obj. Koritzka semi ap. 1/15. Oc. Leitz périplanétique 15 X. (P. Séguin, phot.).

B. EXAMEN DES FROTTIS COLORÉS. — L'imprégnation des cultures jeunes montre surtout des formes courtes de 4-9 tours de spire. Ceux-ci sont aplatis, irréguliers : à 1 tour de spire large succède 1 tour de spire étroit, l'organisme présente ainsi l'aspect bossué, décrit sur la culture vivante (fig. 7 et 8).

Les formes aberrantes sont beaucoup plus longues : 8-42

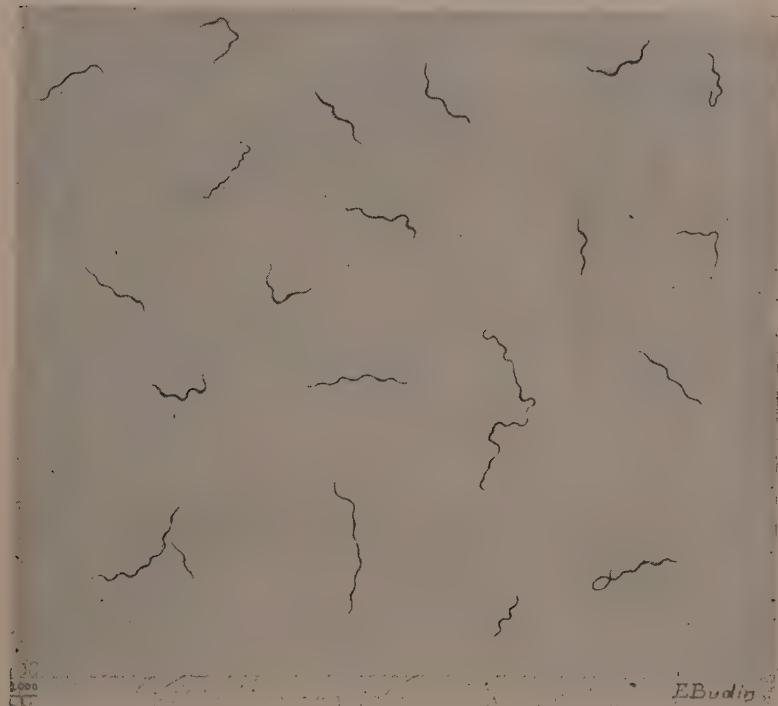


FIG. 8. — *Sp. skoliodonta* (souche *acuta*). Frottis d'une colonie de 6 jours en gélose-ascite, bien séparée d'une colonie de fusiforme. On note l'aspect plat et bossué de l'organisme et les figures de divisions homotypiques simple et multiple.

tours et davantage. Les tours de spire sont plats, irréguliers. On note souvent des amas en écheveaux.

2^o Morphologie en culture âgée.

A. EXAMEN AU FOND NOIR. — Les cultures de trois semaines en bouillon-sérum-rein, examinées au fond noir, ne présen-

tent plus qu'une mobilité très atténuée. On ne voit plus que de rares éléments, animés de mouvements vermiculaires. On remarque encore beaucoup de formes détendues, filamenteuses et des images nombreuses de division hétérotypique.

B. EXAMEN DES FROTTIS COLORÉS. — Sur les frottis imprégnés, ce sont surtout les divisions hétérotypiques aboutissant à la libération de microspirochères qui attirent l'attention. Les filaments ondulés terminaux sont assez fréquents, mais ils sont difficiles à imprégner.

Les granules spirochétogènes sont très petits, analogues à ceux du *Sp. microdentium* : leurs dimensions exiguës et la difficulté de les mettre en évidence rendent leur étude très délicate.

ISOLEMENT.

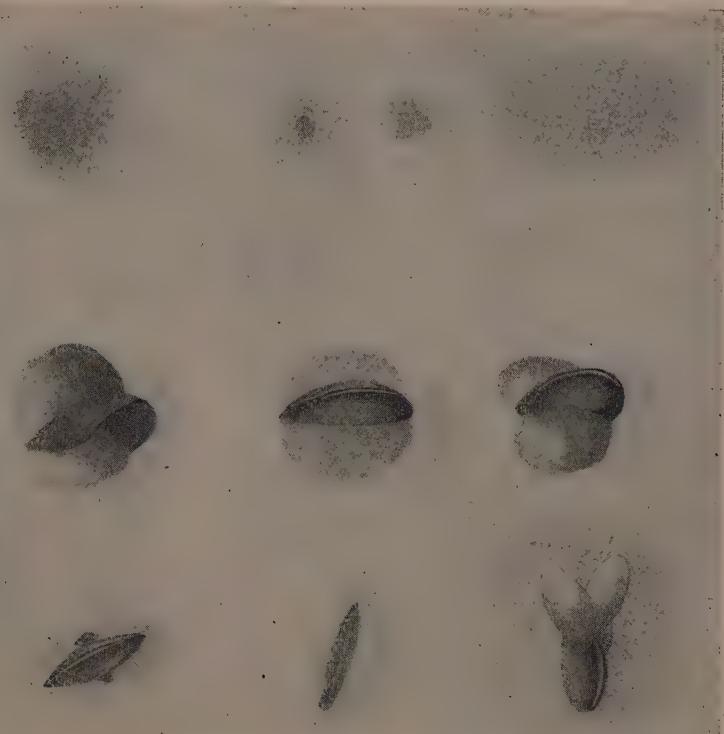
La plupart des souches de *Sp. skoliodonta* ont été isolées dans le milieu de R. Vinzent et Daufresne, c'est-à-dire en gélose MS-rein frais. Les colonies apparaissent au voisinage même du rein. Elles sont très anaérobies, très délicates et leur isolement requiert les plus grands soins.

Cependant deux souches au moins (*acuta*, A. de V.) ont pu être obtenues en culture impure dans des milieux plus simples. L'étude de l'une d'elles (*acuta*) a été le point de départ d'expériences que nous considérons comme très importantes ; elles nous fournissent en effet des renseignements précieux sur les conditions biologiques qui régissent l'association des bacilles fusiformes et des spirochètes.

En ensemencant, par piqûre, en gélose-ascite, le pus d'un abcès sous-cutané de cobaye, survenu après inoculation à l'animal de sécrétions pyorrhéiques, l'un de nous obtint, en 1920, des colonies de bacille fusiforme du type Vincent (*Fusiformis fusiformis* Topley et Wilson) qui se développèrent en trois-quatre jours le long de la strie d'ensemencement. Il s'agissait de colonies semi-circulaires ou discoïdes, opaques, gris jaunâtre, parfois bourgeonnantes, à contours nets et réguliers (voir fig. 9). Puis, quelques jours après (de six à sept jours après l'ensemencement), on remarqua que certaines d'entre elles étaient entourées d'un halo très léger (voir fig. 9).

Au fond noir, on vit que ce halo était constitué par des colonies d'un spirochète nouveau, qui fut désigné sous le nom de *Sp. acuta* et devait être ultérieurement identifié à *Sp. skoliadonta*.

Des imprégnations de colonies mixtes furent réalisées.



C. CONSTANTIN.

FIG. 9. — En haut, colonies pures en gélose-ascite de *Sp. skoliadonta* (souche *acuta*), au centre colonies pures de *B. fusiforme* (*Fusiformis fusiformis*, Topley et Wilson); en bas, colonies mixtes de *fusiforme* entourées d'un halo de spirochètes.

Des fragments de gélose fixés au mélange formol-alcool furent imprégnés par la technique de Manouélian, inclus dans la paraffine et coupés en coupes séries. L'examen des coupes (voir fig. 10) montre la démarcation nette entre la colonie du *B. fusiforme* et celle du spirochète. Les éléments spiralés

pénètrent profondément dans le milieu en s'éloignant du germe qui a permis leur croissance. On saisit ainsi comment l'isolement des spirochètes est possible dans les milieux solides. On remarque également que cette diffusion étendue des spirochètes, à partir d'un centre de multiplication, caractérise le développement de ces organismes aussi bien « in

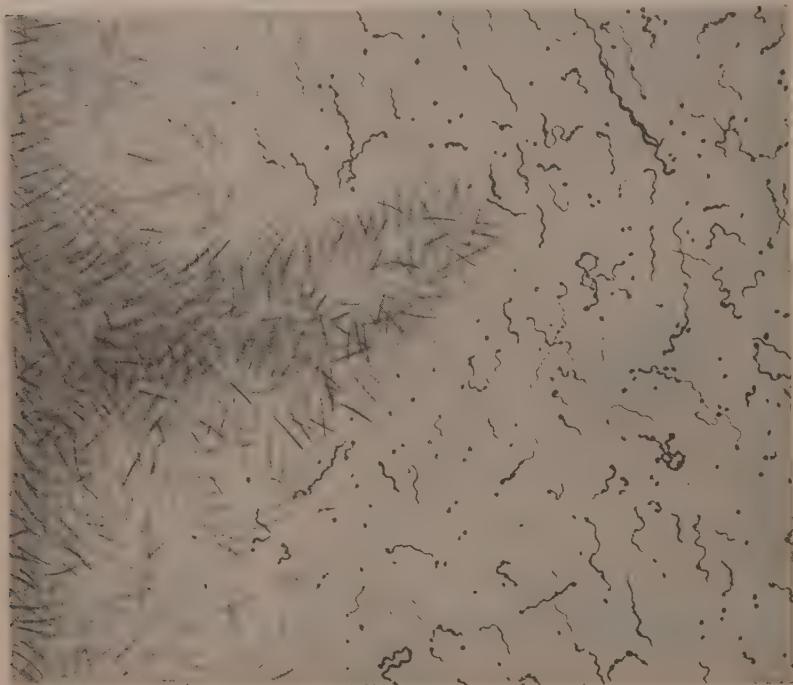


FIG. 10. — Dessin d'une coupe imprégnée de colonie mixte de *B. fusiforme* et de *Sp. skolioidonta* (souche *acuta*). A gauche, *B. fusiforme*, à droite *Sp. skolioidonta* qui envahit profondément la gélose-ascite.

vitro » qu' « in vivo ». Dans de nombreuses lésions humaines ou expérimentales, la diffusion des spirochètes dans les tissus, loin du germe qui a favorisé leur virulence, a pu de même être observée.

Des repiquages de la culture mixte furent entrepris dans le même milieu (gélose-ascite profonde par piqûre) et on put ainsi conserver des deux germes pendant des années. Les

colonies de fusiforme apparaissaient toujours les premières, puis deux-trois jours après, on distinguait les halos, caractéristiques, constitués par les colonies des spirochètes. Certaines colonies nuageuses se détachaient même des colonies mixtes (voir fig. 41), c'étaient des colonies pures de spirochètes. Il semblait facile, en partant de certaines de ces dernières, les mieux séparées, d'isoler le spirochète et d'en obtenir des cultures pures. De nombreuses tentatives nous démontrèrent à l'époque qu'il n'était pas possible, avec les milieux dont nous disposions alors, de réaliser cet isolement. Ni la gélose-ascite, ni la gélose-sérum, ni le bouillon-sérum, ni le sérum hémicoagulé, tous cependant additionnés de rein frais de lapin, ensemencés avec des colonies pures de spirochètes, ne permirent un développement appréciable du germe. Par contre, si l'on ensemencait les colonies mixtes, fusiformes et spirochètes prospéraient dans tous ces milieux.

L'un de nous eut alors l'idée de séparer les fusiformes des spirochètes par une membrane de collodion (8).

Des sacs de collodion montés sur des tubes de verre de même diamètre (4-5 millimètres) sont remplis d'eau physiologique, introduits dans des tubes de 17 millimètres contenant environ 10 cent. cubes d'eau physiologique. Le raccord du tube porte-sac et du tube de 17 millimètres est établi par un joint de coton cardé. Le tube porte-sac est également bouché au coton. L'appareil monté est stérilisé à l'autoclave, à 120°.

Pour réaliser l'expérience, on vide avec une pipette à boule le sac de collodion (en ayant soin de ne pas le percer) et on substitue à l'eau physiologique (toujours à la boule) de la gélose-ascite liquide et tiède, préalablement ensemencée avec du bacille fusiforme.

Puis, dans un tube de 17 millimètres stérile, on distribue à la boule 10 cent. cubes environ du même mélange de gélose-ascite liquide et tiède qui a été préalablement ensemencé avec une colonie séparée de spirochète. Ceci fait, après avoir enlevé le coton de ce tube, on y introduit rapidement le sac de collodion. Le coton entourant le tube porte-sac sert à clore ce nouvel appareil ; on porte à l'étuve.

Le développement des colonies est intéressant à suivre. Dans la gélose-ascite remplissant le sac de collodion apparaissent en deux à trois jours les colonies de *B. fusiforme*. Puis, avec un retard de vingt-quatre heures à quarante-huit heures, on voit apparaître tout autour du sac les colonies nuageuses

(8) SÉGUIN (P.), 1920. *Loc. cit.*



FIG. 11.



FIG. 12.

FIG. 11. — Tube de gélose-ascite ensemencée avec une culture mixte de *B. fusiforme* et de *Sp. skoliodonta* (souche *acuta*). Au centre, colonies de fusiforme. Les colonies de spirochètes diffusent autour de celles de fusiforme.

FIG. 12. — Séparation du *Sp. skoliodonta* (souche *acuta*) en gélose-ascite grâce à l'artifice d'un sac de collodion. La gélose contenue dans le sac a été ensemencée avec le *B. fusiforme*. En dehors du sac et contre lui on voit les colonies floues de spirochètes.

de *Sp. skoliadonta* (fig. 42). On ne peut pas ne pas rapprocher cette localisation des spirochètes autour du sac de celle de ces mêmes organismes autour du rein frais d'organe (en milieu MS, par exemple). Comme les fusiformes ne traversent pas le sac de collodion (les frottis et les ensemenagements des colonies nuageuses le prouvent), on est fondé à admettre que le filtre de collodion laisse passer par dialyse soit des diastases, soit des substances solubles résultant de la digestion des albuminoïdes nécessaires à la vie des spirochètes.

Cette hypothèse se trouve renforcée par l'expérience suivante qui prouve que l'action favorisante des fusiformes sur les spirochètes n'est pas liée à une action spécifique particulière du fusiforme, mais bien à une action protéolytique banale.

L'expérience a été réalisée en substituant au *B. fusiforme* (à l'intérieur du sac de collodion) soit des bactilles anaérobies protéolytiques (*B. sporogenes*, *B. putrificus*, *B. histolyticus*), soit des bactilles saccharolytiques (*B. perfringens*, vib. septique).

Dans la première série d'expériences, les *B. sporogenes*, *putrificus*, *histolyticus*, se comportèrent exactement comme le *B. fusiforme*. Après l'apparition des colonies bacillaires à l'intérieur de la gélose-ascite remplissant le sac, on vit apparaître, dans le milieu extérieur au sac, des colonies caractéristiques de spirochètes ; ces colonies apparaissaient dans les mêmes délais et avec la même abondance qu'en présence du *B. fusiforme*.

Au contraire, après le développement d'un saccharolytique (*B. perfringens*, *V. septique*) dans la gélose incluse dans le sac de collodion, aucune colonie de spirochète ne fut jamais observée dans le milieu adjacent.

Qu'en conclure, sinon que l'action favorisante du *B. fusiforme* n'est pas une action strictement spécifique, mais qu'elle est liée aux propriétés protéolytiques du germe associé. L'expérience montre d'ailleurs chaque jour que la culture des spirochètes est favorisée « *in vitro* » par des bactéries souvent très différentes des fusiformes [vibrions, leptothrix, divers cocci, etc...] (9).

(9) Notons que MARCHOUX et CHORINE ont montré récemment l'action favorisante d'un bacille sur les cultures de *Sp. gallinarum*.

Cette expérience nous apprend encore que certains germes (saccharolytiques, par exemple) n'exercent sur les spirochètes aucune action favorable. Là encore, l'observation est d'accord avec l'expérience.

La technique de symbiose expérimentale que nous venons d'exposer nous paraît le procédé de choix pour étudier « *in vitro* » les rapports des spirochètes avec les bactéries associées.

CARACTÈRES CULTURAUX.

Des faits déjà rapportés, il résulte que si la culture de *Sp. skoliodonta*, en association avec *B. fusiforme*, peut être réalisée dans les milieux les plus divers (milieux au sérum avec ou sans rein), par contre, la culture pure de cet organisme ne peut prospérer qu'en gélose ou bouillon de viande macérée (milieu MS-rein frais) et dans quelques milieux dérivés de celui-ci.

Dans ceux au rein autoclavé ou ne contenant pas de rein, la culture pure est impossible.

Milieux au rein frais.

A. MILIEUX LIQUIDES AU REIN FRAIS. — En bouillon au rein frais additionné de sérum (pH 7,6-7,8), la culture de *Sp. skoliodonta* est toujours des plus difficiles. On ne peut obtenir un développement, du reste léger, qu'en ensemencant richement le milieu liquide avec une culture très jeune (en pleine division homotypique), provenant de la gélose MS-rein. Les cultures obtenues sont difficilement repiquables.

On peut améliorer légèrement le rendement de ce milieu en utilisant, pour sa préparation, du bouillon de viande macérée, au lieu de bouillon ordinaire. On ajoute 1 p. 1.000 de gélose et du rein frais. Ce milieu semi-liquide paraît être actuellement celui qui convient le mieux pour l'étude de la mobilité et de la morphologie de *Sp. skoliodonta*.

Retenons que la culture s'accompagne d'un trouble léger dans le fond du tube, que l'odeur des cultures est très faible ou nulle.

B. MILIEUX SOLIDES AU REIN FRAIS. — Ce sont les milieux de

choix, mais seuls conviennent ceux préparés avec du bouillon de viande macérée.

a) *Gélose-sérum-rein de lapin.* — En milieu MS-sérum (ou succédanés) -rein frais de lapin, *Sp. skoliodonta* donne des colonies délicates qui se localisent au voisinage du rein et autour de la strie d'ensemencement dans le quart inférieur du tube. Puis, au bout de quelques jours, les colonies montent peu à peu vers la surface, mais elles ne dépassent jamais la moitié ou les deux tiers de la hauteur de la gélose.

Ces colonies, généralement floues et confluentes, ne noircissent pas le milieu en vieillissant (même en présence de sérum de boeuf) ; l'odeur des cultures est minime ou nulle.

b) *Gélatine-sérum-rein de lapin.* — Le milieu à la gélatine préparé avec du bouillon de viande macérée, additionné de sérum et de rein frais de lapin permet d'obtenir des cultures assez abondantes. Un trouble manifeste apparaît dans le quart inférieur du tube. Après quinze jours d'étuve à 35°, la culture portée à la glacière ne fait pas prise. *Sp. skoliodonta* ne liquéfie pas la gélatine.

c) *Sérum hémicoagulé-rein de lapin.* — Ce milieu, excellent pour la plupart des spirochètes, convient mal à *Sp. skoliodonta*. Exceptionnellement, des éléments jeunes de souches très entraînées, y donnent un premier développement, mais le repiquage est presque toujours suivi d'insuccès. Le sérum n'est ni noirci, ni digéré. L'odeur de culture est très faible ou nulle.

d) *Gélose-sérum-rein, rouge neutre.* — En gélose MS-sérum additionnée de rouge neutre et de rein frais de lapin, le développement des colonies s'accompagne d'une très légère fluorescence, beaucoup moins apparente que pour les espèces précédentes. Restant localisée au voisinage du fragment d'organe, elle ne tend pas à diffuser dans le reste du tube.

e) *Gélose-sérum-rein, vert malachite.* — Le vert malachite est faiblement réduit. La réaction est tardive (en cinq-huit jours d'étuve), elle est beaucoup moins intense qu'avec les espèces précédemment étudiées.

f) *Gélose-sérum-rein, sous-acétate de plomb.* — La strie d'ensemencement ne noircit pas ou devient faiblement jaunâtre, même après plusieurs semaines d'étuve.

VITALITÉ DES CULTURES.

Ce germe est fragile et doit être repiqué tous les mois en gélose MS-rein frais de lapin.

Associé au B. fusiforme, il peut rester vivant beaucoup plus longtemps, au moins trois mois à l'étuve, en bouillon sérum-rein.

CYCLE ÉVOLUTIF.

Sp. skoliadonta est un mauvais matériel pour une étude de ce genre. Sa petite taille, sa faible réfringence rendent son examen difficile au fond noir. Les cultures en milieux liquides sont habituellement pauvres et conviennent mal pour préparer de belles imprégnations.

Nous pouvons cependant affirmer que les quelques faits que nous avons pu observer sont d'accord avec ceux constatés chez les espèces précédentes. Les nombreuses divisions transversales homotypiques simples et surtout multiples observées dans les cultures jeunes établissent le rôle prépondérant de ce mode de segmentation pour la multiplication intense de l'organisme.

Dans les cultures vieillies, les images de fragmentation hétérotypique dominent. Les spirochétogènes ont été vus, mais leur sort n'a pu être suivi.

PROPRIÉTÉS BIOCHIMIQUES.

Sp. skoliadonta est une espèce délicate qui n'attaque que faiblement les matières protéiques. Non seulement il ne liquéfie ni la gélatine, ni le sérum coagulé, mais encore il n'est pas fétide, il ne réduit que très peu les réactifs colorés et ne noircit pas la gélose au plomb.

Nous avons vu qu'associé au B. de Vincent et à d'autres anaérobies protéolytiques, il peut se développer dans des milieux où, en culture pure, il lui est impossible de s'adapter.

Nous n'avons pu obtenir de développement de ce germe en eau peptonée-sérum gélosée à 1 p. 1.000, l'étude de la fermentation des sucres n'a donc pu être menée à bien.

OXYDO-RÉDUCTION.

L'abaissement du potentiel (électrode basse) est beaucoup moins marqué dans les cultures de *Sp. skoliodonta* que chez les espèces précédemment étudiées. Il atteint à peine, au septième jour —250 millivolts. Cet abaissement passager est suivi d'un relèvement rapide (voir graphique, fig. 13).

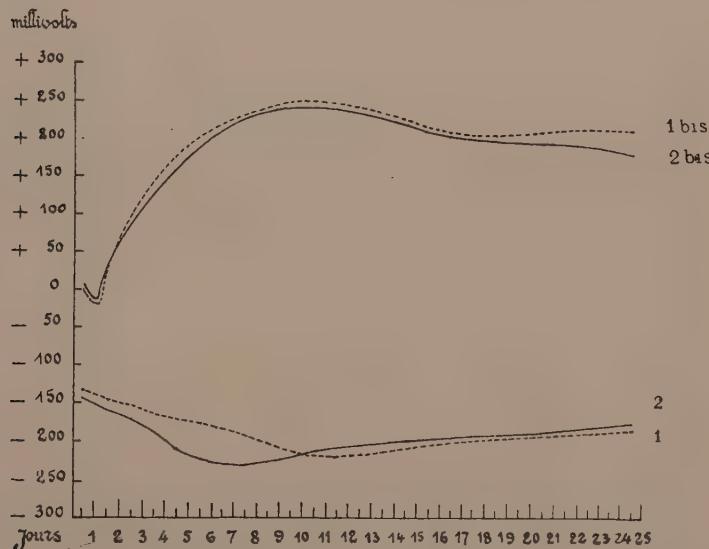


FIG. 13. — *Sp. skoliodonta*, mesures potentiométriques. 1 et 2, tracés de l'électrode basse; 1 bis et 2 bis, tracés de l'électrode haute. Souche C₄ — souche C₈ ~~~~.

La courbe de l'électrode haute est très voisine de celle observée en milieu non ensemencé [voir fig. 2 de notre précédent mémoire (10)].

POUVOIR PATHOGÈNE.

Une culture mixte, en bouillon-sérum-rein, de *B. fusiforme* et de *Sp. skoliodonta* (souche *acuta*) a été inoculée sous la peau du cobaye à la dose de 4 cent. cubes. L'inoculation a été

(10) SÉGUIN (P.) et VINZENT (R.), 1938. *Loc. cit.*

suivie d'un léger œdème auquel a succédé en quelques jours un petit abcès. Dans le pus de celui-ci existaient à la fois le *B. fusiforme* et le *spirochète*. Cette expérience est donc la répétition de celles déjà effectuées avec les autres espèces.

AGGLUTININES.

La difficulté d'obtenir en milieu liquide des cultures abondantes de *Sp. skoliodonta* a rendu la préparation des sérum agglutinants fort difficile. Nous avons cependant pu obtenir un sérum contre la souche *C₁*, agglutinant cette souche homologue à 1/200. Ce sérum a agglutiné presque au même taux la souche *C₂* (1/150). Avec les autres souches, les expériences ont été négatives ou douteuses. Ajoutons qu'aucune de nos souches de *Sp. skoliodonta* n'a agglutiné en présence des sérum préparés contre les autres espèces (*microdentium*, *ambigua*, *comandoni*, *trimerodonta*, etc...).

Nous nous proposons de compléter ces premiers résultats quand les circonstances se montreront plus favorables. Il serait en particulier d'un certain intérêt de préparer un sérum contre notre souche de *Sp. skoliodonta*, provenant d'un ulcère tropical, afin de l'identifier avec certitude aux souches d'origine buccale. Rappelons que cette méthode nous a permis de déterminer avec précision des spirochètes d'origine intestinale (deux *Sp. microdentium* et un *Sp. callipyra*) et de les rapporter ainsi aux souches correspondantes d'origine buccale et génitale (11).

POSITION DANS LA SYSTÉMATIQUE.

Sp. skoliodonta diffère des espèces déjà décrites par sa morphologie particulière et ses caractères culturaux et biochimiques. L'impossibilité de le cultiver en culture pure dans les milieux au rein autoclavé ou dans les milieux sans rein permet de le distinguer de *Sp. microdentium*, *ambigua* et *comandoni*. L'absence de fétidité, le non-noircissement de la

(11) VINZENT (R.) et SÉGUIN (P.), 1939. *Loc. cit.*

gélose au plomb, les caractères atténués des réactions de réduction des réactifs colorés, différencient bien le *Sp. skoliodonta* des espèces sus-nommées.

IV. — *Sp. trimerodonta*, Hoffmann, 1920.

En 1920, Fontana décrivait sous le nom de *Leptospira buccalis* un spirochète morphologiquement semblable au spirochète d'Inada. La même année, Hoffmann distinguait parmi les petits spirochètes de la bouche une forme remarquable par sa mobilité, rappelant celle des *Leptospira* : l'organisme hélicoïdal était animé d'un mouvement d'apparence particulière produit par la rotation rapide de crochets terminaux.

On pouvait supposer que ces deux spirochètes leptospiroïdes constituaient une seule espèce, ainsi que le soutint l'un de nous lorsqu'il reconnut l'abondance de ces formes dans la flore du noma et de la gangrène pulmonaire.

Mais quand R. Vinzent et Daufresne obtinrent en culture pure des spirochètes de ce groupe, il fut facile de reconnaître que tous les éléments cultivés étaient identiques à *Sp. trimerodonta* Hoffmann, aucun d'eux ne possédant la souplesse et l'allure caractéristique des spirochètes d'Inada (voir fig. 14).

On peut donc admettre, jusqu'à nouvel ordre, que *Leptospira buccalis* est, selon toute vraisemblance, une espèce indépendante.

HABITAT.

Les deux organismes signalés par Fontana et par Hoffmann dans la flore de la bouche ont été rencontrés avec une abondance toute spéciale dans les sécrétions du noma et dans celles des affections putrides et gangréneuses des voies respiratoires (Kritchevsky et Séguin, Muttermilch et Séguin, Besançon et Etchegoin, Vinzent et Daufresne, etc...).

L'un de nous a même insisté sur le caractère de mauvais pronostic que la présence des organismes leptospiroïdes

confère à l'infection où on les rencontre en nombre. Il y a cependant lieu de remarquer que sur trois cas de noma étudiés, dans deux, ces spirochètes abondaient, mais, dans le troisième, ils étaient totalement absents.

Les leptospiroïdes de la bouche ne peuvent donc pas être

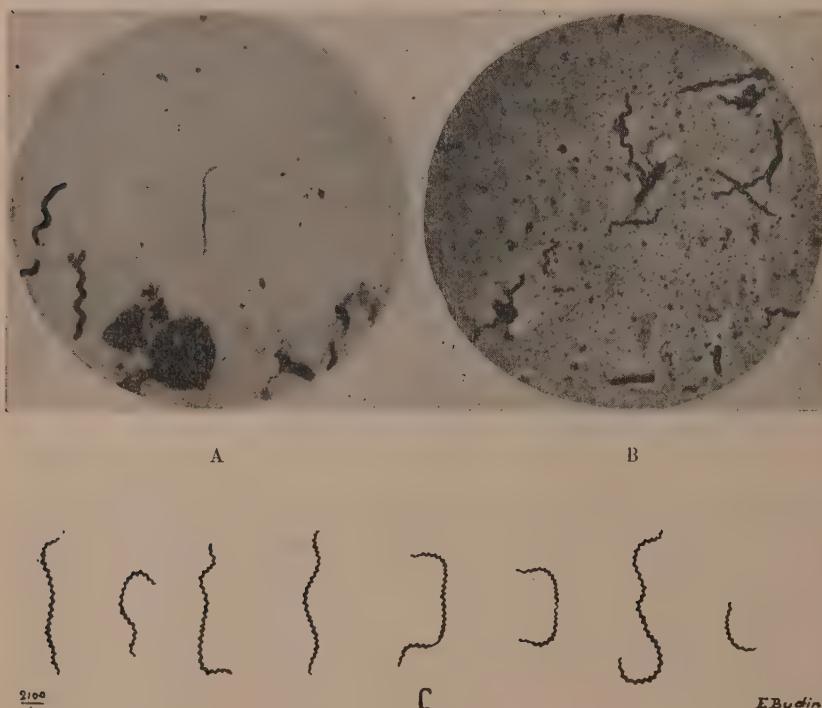


FIG. 14. — A gauche, frottis imprégné de noma; au centre, *Leptospira buccalis* Fontana (Dr Ponselle, phot.). A droite, frottis imprégné de pyorrhée alvéolaire. Au centre, *Sp. trimerodontia* Hoffmann, le spirochète est plus épais et présente les 2 crochets caractéristiques (Dr Ponselle, phot.). En C, différents aspects de *Leptospira buccalis* Fontana, frottis imprégnés de noma.

considérés comme étant toujours présents dans la gangrène buccale. Ils n'en sont certainement pas les agents spécifiques. Les souches étudiées par nous sont au nombre de trois :

D ₁	Pyorrhée.
D ₂	Stomatite.
D ₃	Gangrène pulmonaire.

MORPHOLOGIE.

1^o Morphologie en culture jeune.

Sp. trimerodonta a une morphologie des plus caractéristiques, aussi bien à l'état vivant que sur les frottis colorés.

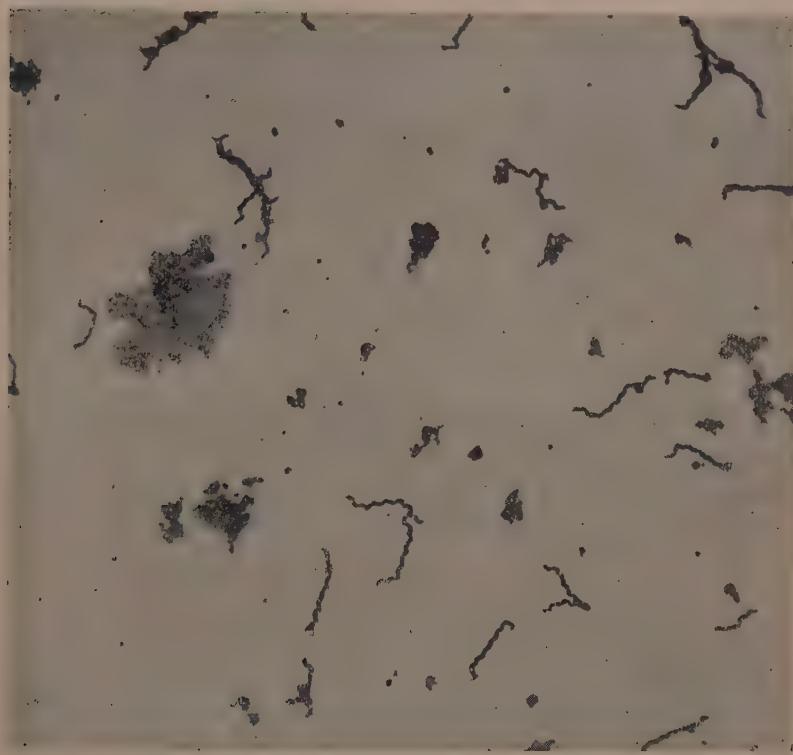


FIG. 15. — *Sp. trimerodonta* Hoffmann (souche D₁). Culture de 5 jours en bouillon K-sérum-rein de lapin. Imprégnation argentique. On remarque de nombreuses formes présentant les crochets terminaux caractéristiques. Les tours de spire sont moins serrés que ceux de *Lepospira buccalis* et rappellent ceux de *Sp. microdontium*. Imprégnation argent. (Photo Jeantet.) Gross. : 1.800.

A. EXAMEN AU FOND NOIR. — En bouillon-sérum-rein frais de lapin, en culture de trois à cinq jours, l'organisme est caractérisé par son aspect et sa mobilité : les éléments isolés montrent avec netteté cette apparence particulière en trois parties

(le corps du spirochète et les deux crochets) qui a valu son nom à l'espèce. Dimensions : longueur, 6 μ ; largeur, 0 μ 3, avec de grandes variations dans la longueur.

Les tours de spire sont étroits et anguleux. Les crochets terminaux présentent une longueur qui n'est pas inférieure au tiers du corps du spirochète. La mobilité est caractérisée par le mouvement en moulinet des crochets ; des mouvements de flexion latérale peuvent être observés quand le mouvement hélicoïdal s'atténue.

Il faut noter qu'une de nos souches, D₂, à ce point de vue nettement aberrante, ne présente le plus souvent qu'un seul crochet terminal à une extrémité, l'autre en étant assez régulièrement dépourvue.

B. EXAMEN DES FROTTIS COLORÉS. — Les imprégnations précisent la structure indiquée. Les tours de spire étroits et anguleux sont cependant moins étroits que ceux de *Leptospira buccalis* et se rapprochent plus de ceux de *Sp. microdentium* (voir fig. 15).

Les divisions transversales simples et multiples sont nombreuses. Elles sont surtout homotypiques. La rupture du périplasme se fait au point de jonction de crochets terminaux. Les chaînes de spirochètes ont ainsi un aspect très particulier.

2^o Morphologie en culture âgée.

A. EXAMEN AU FOND NOIR. — Dans les cultures de trois semaines environ, la mobilité est très atténueée. Seuls, de rares éléments présentent encore le mouvement hélicoïdal propre à l'organisme ; beaucoup de spirochètes sont fragmentés ; on voit, au fond noir, de nombreuses granulations libres.

B. EXAMEN DES FROTTIS COLORÉS. — Les imprégnations font ressortir l'abondance des divisions hétérotypiques. Les fragments inégaux de spirochètes sont fréquents, associés à des formes anormales, épaissies ou filamenteuses. Les granules spirochétogènes n'ont pas été observés.

ISOLEMENT.

Sp. trimerodonta ne peut être obtenu qu'à partir de colonies en gélose MS au rein frais. Les colonies délicates où domine ce germe sont repiquées dans un milieu spécial, à l'extrait d'ascite (12), où la pullulation de l'organisme est remarquable. On peut ainsi se débarrasser des spirochètes associés et obtenir après repiquages en gélose-sérum-rein des cultures pures.

Il est inutile de souligner que ces opérations sont délicates et que ce spirochète est un des plus difficiles à isoler.

CARACTÈRES CULTURAUX.

Comme *Sp. skolioidonta*, *Sp. trimerodonta* ne se développe avec abondance que dans les milieux au rein frais et, de préférence dans ceux à base de bouillon préparé avec la viande macérée. Sa culture pure dans les milieux au rein autoclavé et dans les milieux sans rein est impossible.

Milieux au rein frais.

A. MILIEUX LIQUIDES AU REIN FRAIS. — a) *Bouillon-sérum (ou succédanés) -rein frais de lapin*. — Dans ces milieux, la culture est très irrégulière, parfois très pauvre et difficilement repiquable, parfois assez abondante.

Dans les cas les plus favorables, un trouble apparent se manifeste dans le fond du tube et remonte lentement vers la surface ; les ondes moirées sont absentes. L'odeur de la culture est très légèrement sulfhydrique ou nulle.

Le rendement paraît amélioré (comme pour *Sp. skolioidonta*) lorsqu'on utilise au lieu de bouillon ordinaire de l'extrait de viande macérée.

B. MILIEUX SOLIDES AU REIN FRAIS. — a) *Gélose MS au rein*

(12) SÉGUIN (P.) et VINZENT (R.), 1938 (*loc. cit.*, p. 266).

de lapin. — C'est le milieu de choix. Les caractères culturaux rappellent de très près ceux de *Sp. skoliodonta*. Mêmes halos légers localisés dans le fond du tube et remontant lentement vers la surface ; le milieu prend toutefois un aspect plus trouble.

b) *Gélatine MS-rein de lapin.* — A 35°, développement faible qui se manifeste par un trouble léger dans le fond du tube. Après quinze jours d'étuve, le milieu porté à la glacière fait prise ; la gélatine n'est donc pas liquéfiée. Odeur nulle.

c) *Sérum hémicoagulé-rein de lapin.* — Dans ce milieu, *Sp. trimerodonta* se développe lentement et reste longtemps mobile (deux-trois mois d'étuve). Mais la culture est moins abondante et moins régulière qu'en gélose MS. Le sérum ne noircit pas et n'est pas liquéfié après un mois d'étuve.

d) *Gélose MS-rein, rouge neutre.* — Le rouge neutre est réduit tardivement avec fluorescence légère.

e) *Gélose MS-rein, vert malachite.* — Le vert malachite est faiblement réduit après un séjour prolongé à l'étuve. *Sp. trimerodonta* se comporte à ce point de vue comme *Sp. skoliodonta*.

f) *Gélose MS-rein, sous-acétate de plomb.* — Le noircissement du milieu n'apparaît que lentement et reste localisé au tiers inférieur du tube.

VITALITÉ DES CULTURES.

Sp. trimerodonta est un germe fragile qui doit, comme *Sp. skoliodonta*, être repiqué obligatoirement chaque mois en gélose MS-rein frais.

CYCLE ÉVOLUTIF.

Nous n'avons pu encore mettre en évidence les granules spirochétogènes chez cette espèce. Le cycle évolutif n'a pas été suivi. Retenons seulement la fréquence des divisions hétérotypiques dans les cultures vieillies, conformément à la règle déjà établie sur d'autres espèces.

PROPRIÉTÉS BIOCHIMIQUES.

Très voisine de celle de *Sp. skoliodonta*, l'action sur les matières albuminoïdes paraît un peu moins faible cependant. L'action sur les sucres n'a pu être étudiée.

OXYDO-RÉDUCTION.

L'examen du graphique (fig. 16) montre que l'abaissement

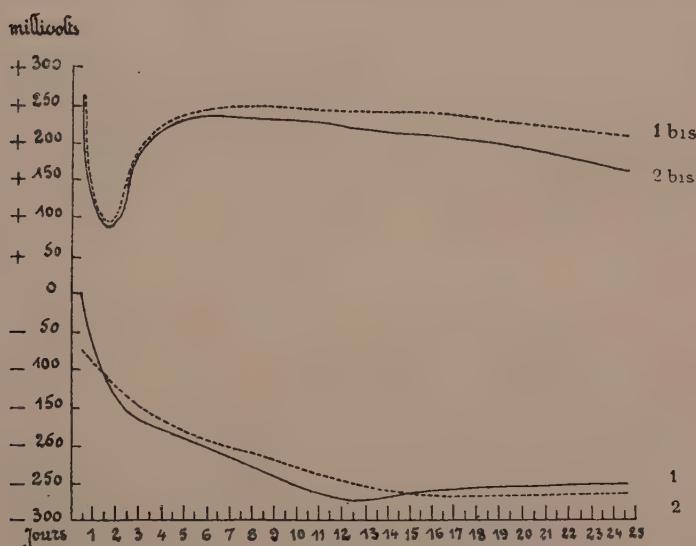


FIG. 16. — *Sp. trimerdonta* mesures potentiométriques. 1 et 2, tracés de l'électrode basse; 1 bis et 2 bis, tracés de l'électrode haute. Souche D, — et D₂, - - - - -.

du potentiel (électrode basse) est très marqué, jusqu'à —270 millivolts, mais beaucoup plus tardif que chez les autres espèces étudiées. Il est atteint entre le douzième et le quinzième jour de culture en milieu MS.

POUVOIR PATHOGÈNE.

C'est la seule espèce où le mélange fusiforme (B. de Vincent) + spirochète (5 cent. cubes sous la peau) n'aït produit aucune lésion appréciable chez le cobaye.

Cet échec peut tenir à la virulence trop faible de la souche du spirochète utilisée (D_1).

AGGLUTININES.

Malgré les difficultés inhérentes à la culture de ce germe en milieu liquide, nous avons pu préparer un sérum contre la souche D_1 . Ce sérum agglutinait la souche homologue à 1/300. La souche D_2 agglutinait nettement à 1/200. La souche D_3 n'a pas visiblement agglutiné.

Il semble donc que chez *Sp. trimerodonta*, comme chez les autres spirochètes buccaux, il existe des races sérologiques indépendantes.

Ajoutons que chez *Sp. trimerodonta*, les agglutinations ont été constamment négatives avec les sérum préparés contre les petites espèces de spirochètes buccaux.

POSITION DANS LA SYSTÉMATIQUE.

La morphologie caractéristique de l'organisme le distingue de toutes les espèces déjà étudiées.

En ce qui concerne les caractères culturaux et biochimiques, *Sp. trimerodonta* est très voisin de *Sp. skoliodonta*. Comme lui, il ne se développe que dans les milieux au rein frais préparés avec du bouillon de viande macérée. Il attaque très faiblement les substances protéiques. A retenir la possibilité du développement de ce spirochète dans l'extrait d'ascite, caractère qu'il ne partage qu'avec des espèces très différentes, *Sp. macrodentium* et *Sp. orogyrata*.

Conclusion.

Après avoir obtenu, en cultures pures, plus de 40 souches de spirochètes buccaux rentrant dans le groupe des « petits spirochètes », nous avons vu qu'il était possible de les classer dans cinq espèces distinctes par leur morphologie, leurs caractères culturaux et biochimiques et leurs propriétés biologiques. Nous aurions pu, sans difficulté, doubler au moins le

nombre des espèces décrites, en élévant au rang d'espèces, des types un peu aberrants par quelques propriétés morphologiques et biologiques. Dans un intérêt de clarté, nous avons préféré limiter notre travail aux coupures décrites. Nous pensons qu'en dehors du *Leptospira buccalis* Fontana, il ne reste dans la flore buccale et pulmonaire que bien peu de petits spirochètes nouveaux à cultiver et à décrire.

D'ores et déjà, l'étude comparative de *Sp. microdentium*, *Sp. ambigua*, *Sp. comandoni*, *Sp. skoliodonta* et *Sp. trimerodonta* nous permet de saisir comment ont pu se différencier ces espèces. La plus protéolytique de toutes, *Sp. microdentium*, est de beaucoup la plus facile à isoler des germes associés. Elle s'adapte dans les conditions anaérobies à tous les milieux contenant du sérum.

Bien moins protéolytiques, quoique décomposant encore les albumines en produits fétides, *Sp. comandoni* et *Sp. ambigua* sont plus difficiles à séparer des germes associés. Lorsque cette séparation est effectuée dans les milieux additionnés d'organes frais, ces germes s'adaptent plus ou moins vite aux milieux sérieux contenant des organes stérilisés ou même privés de ces organes.

Enfin *Sp. skoliodonta* et *Sp. trimerodonta* qui sont les espèces les moins protéolytiques de la série, ne peuvent se développer à l'état pur que dans des milieux déjà digérés (bouillon de viande macérée) et contenant des fragments d'organe frais.

Leur adaptation en culture pure aux milieux au rein autoclavé ou sans rein est impossible. Ces spirochètes ne peuvent s'y développer qu'en culture mixte, avec un germe favorisant : soit le *B. fusiforme*, soit d'une façon plus générale un organisme capable d'attaquer les substances protéiques.

Une association fuso-spirochétique apparaît donc d'autant plus difficile à rompre que le spirochète présent dans l'association attaque plus difficilement les albumines du sérum.

Ces faits établis par l'étude systématique des petits spirochètes de la bouche nous semblent essentiels pour comprendre la nature même de l'association fuso-spirochétique. Des recherches ultérieures sur d'autres spirochètes commensaux en montreront la grande généralité.

BIBLIOGRAPHIE

BEZANÇON et ETCHEGOIN. *Acad. de Médecine*, **95**, 1926, p. 473.
 COMANDON. *Arch. de Parasitologie*, **13**, 1909.
 FONTANA. *Pathologica*, 15 janvier 1920, p. 13.
 HOFFMANN. *Deut. mediz. Wochenschrift*, 4 mars 1920, p. 356.
 KRITCHEVSKY (B.) et SÉGUIN (P.). *Odontologie*, novembre 1921.
 KRITCHEVSKY (B.) et SÉGUIN (P.). *Revue de Stomatologie*, **27**, 1925, p. 46.
 MARCHOUX et CHORINE. Ces *Annales*, **51**, 1933, p. 477.
 MUTERMILCH et SÉGUIN (P.). *C. R. Soc. Biol.*, 13 janvier 1923, p. 28.
 SÉGUIN (P.). *C. R. Acad. Sc.*, **171**, 1920, p. 1243.
 SÉGUIN (P.). *Annales de Dermat. et Syphiliogr.*, **10**, n° 10, 1939-1940.
 SÉGUIN (P.) et VINZENT (R.). Ces *Annales*, **61**, septembre 1938, p. 255.
 VINZENT (R.) et DAUFRESNE (M.). *C. R. Soc. Biol.*, **126**, 1934, p. 490.
 VINZENT (R.) et DAUFRESNE (M.). *C. R. Soc. Biol.*, **128**, 1936, p. 770.
 VINZENT (R.) et SÉGUIN (P.). *Bull. Acad. de Médecine*, **121**, 1939, p. 407.
 VINZENT (R.) et SÉGUIN (P.). *C. R. Soc. Biol.*, **130**, 1939, p. 12.

Le Gérant : G. MASSON.

